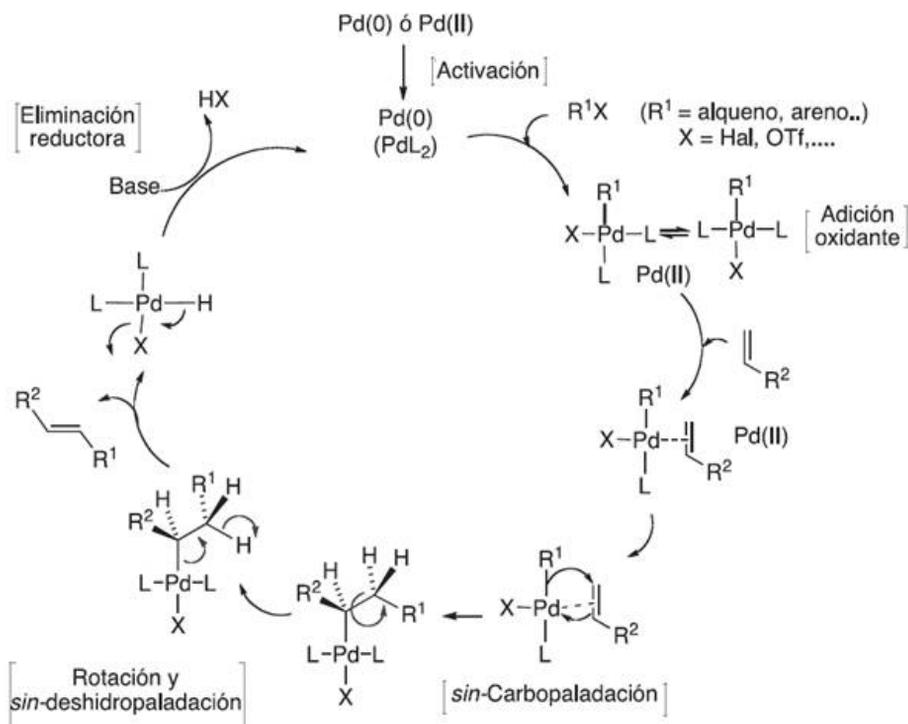




# RANF

An. R. Acad. Nac. Farm.  
Vol. 76. n. 4 2010  
ISSN 1697-4271  
Publicación electrónica  
trimestral





## **Innovation vs. tradition: the election of an european way toward pharmaceutical industrialisation, 19<sup>th</sup>-20<sup>th</sup> centuries**

**Antonio González Bueno<sup>1,\*</sup>, Raúl Rodríguez Nozal<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias Sanitarias y Médico-Sociales. Facultad de Medicina. Universidad de Alcalá.

Recibido el 14 de octubre de 2010.

### **ABSTRACT**

This paper discusses the scientific and technological factors that coincided in the beginning and in the initial development of the pharmaceutical industry in Europe. Having pointed out the reasons that favoured the initial success of the German chemical pharmaceutical industry, we evaluate the efforts of other countries to occupy the leadership of this industrial sector: from the British trials of business concentration to all the strength of the Swiss as a neutral nation in conflicts of war; a special tractor will be dedicated to the study of the penetration of German industry in France, in particular, in the systems invented by German manufacturers to violate the French protectionist legislation. In concluding, we describe the two industrialization models followed by the pharmaceutical industry during the decades of change of the 19<sup>th</sup>-20<sup>th</sup> centuries. We evaluate and explain the social, economic, cultural and, above all, scientific-technical reasons that defined both and discuss the motives that led to the current situation of leadership of the central European model in the pharmaceutical sector.

**Keywords:** Pharmaceutical industry; history; Europe.

## RESUMEN

### **Innovación vs. tradición: la elección de un modelo de industrialización farmacéutica en la Europa de los siglos XIX y XX.**

Analizamos los factores científicos y tecnológicos que confluyeron en el inicio y primer desarrollo de la industria europea del medicamento. Tras señalar las razones que favorecieron el auge inicial de la industria químico-farmacéutica alemana, pasamos a valorar los esfuerzos de otros países por ocupar el liderazgo de este sector industrial: desde los ensayos británicos de concentración empresarial hasta la potencialidad de Suiza como nación neutral en los conflictos bélicos; un capítulo especial queda dedicado al estudio de la penetración de la industria alemana en Francia, en particular, a los sistemas ideados por los fabricantes alemanes para violar la legislación proteccionista gala. Para concluir, caracterizamos los dos modelos de industrialización seguidos por la industria farmacéutica durante el gozne de los siglos XIX y XX; se valoran y explican las razones sociales, económicas, culturales y, sobre todo, científico-técnicas que les definen y se discuten los motivos que condujeron a la actual situación de liderazgo del modelo centroeuropeo en el sector farmacéutico.

**Palabras Clave:** Industria farmacéutica; historia; Europa.

## 1. INTRODUCTION

The stages that define process of industrialisation in Europe are not uniform; their differences have their roots, as wisely pointed out by the German sociologist Max Webber at the beginnings of the 20<sup>th</sup> century (1) in the 'spirit of capitalism' which defines the countries of the centre and north of Europe, with the 'traditionalist' temperament of the Mediterranean Europe. The different mentality and the different rent *per capita* with which the countries of the centre and north of Europe (the 'Protestant Europe') faced the 'industrial revolution' as opposed to those washed by the Mediterranean (the 'Catholic Europe'), is undoubtedly.

The genesis of the European pharmaceutical industry is not indifferent to this situation as a whole; even though, together with the social factors, economic or political definers of any type of industrial activity others of a scientific and technological character should be considered as well. Among the most important is the appearance of the active principles of synthesis and semi-synthesis as well as the arrival of new pharmaceutical forms, more adaptable to the requirements of large-scale elaboration demanded by the new pharmaceutical industry.

From the middle of the 19<sup>th</sup> century, the industry of active principles and, above all, those relative to chemical synthesis of medicines from carbon, were dominated by Germany, thanks to the hegemony in the field of organic chemistry of industrial application. Other countries in central Europe, such as Switzerland, or those of Anglo-Saxon culture such as England, also tried to get a look into this market, principally after the outbreak of the First World War.

The Mediterranean Europa —France, Italy or Spain— could never compete with the large pharmaceutical chemical industries established in ‘Protestant Europe’; their contribution to the development of the drug industry would come with the adaptation of pharmaceutical tradition to large-scale elaboration, principally through the creation of new services of forms of drugs and the industries for their commercialisation.

The modernisation of pharmaceutical technique came about in the last 30 years of the 19<sup>th</sup> century as a result of the efforts of the pharmacy collective at an attempt at compatibility with the traditional *modus operandi* and the new scientific doctrines. With the exception of injectable vials, invented in 1886 after the development of asepsis, the new pharmaceutical forms which would revolutionize the therapy and the professional habits of medical and chemists professionals, came into being throughout the long period between 1833 and 1853. During this time, the principal forms of oral administration were invented: gelatine capsules (1833), pills (1843) and amyloseous capsules (1853).

The perfection of these preparations was intimately linked to the birth and development of the drugs industry as their elaboration was undertaken with the use of specific machinery. The existence of forms for the drugs is therefore, necessary for their industrial development. However, and although this seems paradoxical, these were not invented by the large pharmaceutical laboratories but by the chemists, in

an attempt to resolve old pharmaceutical problems and to adapt the dispensary tactics to the new sciences of health. This modernisation of the professional collective of pharmacy was made use of by the drugs industry for its own development. In effect, both traditional pharmaceutical preparations as well as the modern pharmaceutical forms appearing in the last 30 years of the 19<sup>th</sup> century would be subjected to a profound technological recycling in order to accelerate and make the process of production profitable (2, 3).

In the following pages we will try to discern and typify most models of industrial development. We shall endeavour to define what the characteristics are that, from a technical option, define both models. The drugs industry presents some of its own characteristics that differ from the chemical industry, to which they tend to be united conceptually. It is certain that both have in common —although more so today— the use of processes of similar production, but they differ —more so in the past— in the finality itself of the finished product. The drug is not always of chemical origin and for this its industrialisation process is not strictly comparable with that of the chemical industry in general. The specificity of the pharmaceutical industry is closely related to the final aspect with which the drug is presented, the pharmaceutical dosage form (4).

The European chemical industry has been the object of a great number of studies, some of which have centred on strictly technological aspects or of industrial projection (5, 6), others have attacked the problem from an economic or political viewpoint (7, 8), although others have compared the models of industrialisation followed by different European countries (9, 10). Our work attempts to deal with the peculiar characteristics of the pharmaceutical industry, whose origin resides in the existence of a professional group dedicated, previous to the appearance of manufacturing processes, to the artisan elaboration of medicines. The models of compliance of these professionals, to new industrial techniques, is the object of this paper.

## **2. THE INNOVATION: THE CENTRAL-EUROPEAN MODEL**

From the last quarter of the 19<sup>th</sup> century, chemical industries began to take on an importance in the consolidation of the European

capitalist system, which until then had been limited to textile manufacture, the iron and steel industry and mining.

At the beginning of the First World War, German predominance in the chemical sector was unquestionable; no other world power was able to compete with the German giant. German leadership was evident from 1871 on, dating from the end of the Franco-Prussian war and the commencement of German unification. The main field of action was that of dyestuff industries, appearing in the middle of the 19<sup>th</sup> century, due to the reuse of residues originated in the operations of distilling bituminous coal distillation. With reference to the organic chemistry industry in particular, more than half the total of the chemical production exported by Germany in 1912 corresponded to dyestuffs, perfumes or drugs, and the sales abroad of these products exceeded the total figure of exports in the rest of the world (11). This was, without doubt, the golden age of the German chemical industry, after which the figures descended gradually due to competition of other countries such as the United States, France or England. In 1916, there were 4.000 chemical remedies synthesised in Germany (more than 200 were the most used and exported), representing the greater part of those existing in the world and which were produced in no less than 20 large factories (12). In 1924 the German contribution to the world market of synthetic dyestuffs was barely 40% of the exports, although still the highest in the world, they had dropped considerably (13). This productive centres basing their activities on the tars obtained from diversity was not capricious. They were coaltar, residues from other industries and at the same time raw materials for the elaboration of these articles and others, as important for national defence as the explosives. This concept of integrated chemical industry is especially useful for the understanding of the tentacular scheme of enterprises in the cleaning industry.

The devastating advance of the German chemical industry would have repercussions especially in those countries which, until then, had been leaders in this market. The most representative case perhaps is that of England; leader of this industry during the central decades of the 19<sup>th</sup> century, it underwent a progressive deterioration, almost inversely proportionate to German growth, and would acquire almost critical overtones during the change of the century. The conflict of 1914 would oblige them to carry out a profound examination of con-

science, aimed at analysing and attempting to meet the enemy, with both the arms of science and industrial progress.

The British effort was worthy of praise, although not as productive as would have been wished; the self-critical analysis of the causes that provoked industrial weakening and the possible recipes for trying to palliate their disadvantageous situation with respect to Germany, were amply debated subjects in scientific, commercial and political forums throughout the first quarter of the 20<sup>th</sup> century. The key to their failure was the same that had propitiated the German triumph: namely, industrial scientific training at high level and development of applied research. The solutions to overcome this situation lay, obviously, in the emulation of the only possible model, that followed by Germany, eg., the design of an *ad hoc* educative infrastructure, and entrepreneurial investment in chemical research.

The manufacture of dyestuffs is a paradigmatic example of this situation. This industry, born in England after the discovery of mauveine by William Henry Perkins, was soon to be snatched from them (14). In 1913, England imported 17.000 tonnes of artificial dyestuffs, of which 90% corresponded to operations in which Germany was the remittent and the remainder came from Switzerland. In an attempt to lift this dependency, at least partially, possibly for motives of national pride, the British government became involved in a project to create a national industry of dyestuffs with state capital. This project took the form of *The British Dyes Co. Ltd.*, which, after its fusion (1918) with other factories, became known as *British Dyestuff Corporation*. With a very strong protectionist policy against colouring materials made outside England, this Society started off its career in the difficult market of derivatives of coaltar (15). The British effort was to produce an important increase in these products and a descent in importations, although at the cost of an important deficit originating from multiple factors, among which an insufficient domestic market and the rather weak uncompetitive export resources can be highlighted, precisely, associated to the protection measures laid down by the British government.

Following in the footsteps of Germany, England attempted to resolve these problems by means of business concentration. The results of these efforts were an integrated *British Chemical*, formed by the merger of the *United Alkali Co.*, the *Nobels Co.* and the *Brummer Mond*,

capable of assuming not only the production of dyestuffs but also fertilisers, explosives, sulphuric acid, etc. (13, 16). In spite of all the difficulties, more so, if we compare them with the Mediterranean European countries, England continued to be an important power in the chemical pharmaceutical industry and drug sector.

Chemical drugs also sustained a considerable development in Switzerland especially in Basle, one of the most important nuclei of the world chemical pharmaceutical industry (12). The upsurge of Swiss dye industries during the first 15 years of the 20<sup>th</sup> century, a specially negative period for this type of activity in France and England, can be explained by a cumulous of circumstances of synergistic effect: specialisation in the fabrication of products, some of which were authentic monopolies; quality of the commercialised products, partly due to acceptable research planning; permissiveness and collaboration with the German dying industry; and greater facility for the sale of its production due to its condition of neutrality.

The typical pharmaceutical dosage forms used by the pharmaceutical industries in the Central-European countries was tablets. We owe the invention of tablets to the Englishman William Brockedon who, on December 1843, patented this product in his country under the domination of "Shaping pills, lozenges and black lead by pressure in dyes". His intention was to eliminate from the pill formulation all the excipients, generally of a glutinous cohesion nature which made the later desegregation dissolution and internal absorption of these preparations more difficult. On general lines, the idea of Brockedon was formed by a cylindrical compressor, a matrix and mortar, which the author himself would describe exhaustively in the text corresponding to the patent of his invention (17, 18). The operation that characterises this pharmaceutical form and allows the preparation to be converted in the most adaptable way for the requirements and the technology of the new medicinal industry. The fabrication of tablets is, essentially, industrial. If at any time dispensary elaborations were carried out, principally in the countries of the European Mediterranean area, these were made possible thanks to the adaptation of manufacturing technology to the necessities of the chemist.

The pharmaceutical form invented by Brockedon remained inert for nearly 30 years. During the period 1843 to 1872, work relative to

this invention, and possibly its improvement, was little and of scant relevance. The year 1872 can be considered as the real takeoff of the elaboration of tablets, with the presentation by the German Isidor Rosenthal of a new system of manual compression, based on the action of a screw press which supplied the compression force (19). These machines opened a new page in the history of drugs, and began a process of improvement and popularisation unknown till then by any pharmaceutical preparation.

If Germany became one of the principal suppliers of this new technology to the pharmaceutical world, the other was the United States. The Americans, in the same way that the teutons had done, developed their own procedures of compression, competing directly, in space and in time with German technology and, contrary to what happened with the latter, taking into account the first English patents. North American research in this field gave fruit and this time the technological innovation would be truly original; on the one hand the manual lever press (1879) and on the other, the excentrical and vertical tableting compressor machine (1874) also activated manually but with the vocation of being able to transform itself or influence in future automatic inventions. Two technological proposals that would compete during the last quarter of the 19<sup>th</sup> century, with the German screw press, in an endeavour to achieve hegemony which was exclusively based on criteria or parameters of mechanical origin. The German-North American competition in this field should not be understood to be based on reasons or postulations of a strictly pharmaceutical type, focused on obtaining a final product of formulation, desegregation, solubility and optimum stability but rather on arguments of technological basis, more concerned with engineering than pharmacology (20, 21).

The tools used to carry out the elaboration of tablets respond essentially to one same reason, sustained on two premises which, in our opinion, are fundamental for understanding the success of this pharmaceutical form and its excellent industrial implantation: the tendency towards the unification of all the procedures of pressure and the search for processes of continual function, capable of achieving a total automation of the machinery (17, 22).

Another pharmaceutical dosage form used by the Centro-European industries was a rebirth of the french capsules, adapted in the 1870s

for dealing with large-scale elaborations. The North American pharmacist, Frederick A. Hubel was probably, the first to prepare, around 1874, hard gelatine capsules on wholesale scale using a mechanical device, manufactured by himself, which would be subject to successive improvements until finalising in the first patent for an apparatus of this type (1877). The period 1877-1883 was the most fertile time as regard to patents for capsule making machines, and the years immediately following these are those of final consolidation of the great industry of hard gelatine capsules (23, 24). At the beginnings of the 20<sup>th</sup> century machinery had already displaced the manual worker. There were those who gave 'objective' reasons for choosing mechanical procedures in detriment of the artisan, based on criteria of uniformity, appearance, solubility, stability and profitability. The success of the procedures for manufacturing hard gelatine capsules among the main drug industries resides on the suitability of the different stages that this type involves and the technological possibilities of the machinery used. The great achievement is separating the phases obtained by the capsular support and the closed filling in two totally independent industrialised processes. Given the difficulty of agglutinating these operations in the same machine, it was decided to give the elaboration of empty capsules to firms specialised in this matter.

### **3. THE TRADITION: THE EUROPEAN-MEDITERRANEAN-MODEL**

The fragility of the French chemical pharmaceutical industry compared with that of Germany was evident, mainly in reference to organic chemistry. On the reverse, both the inorganic chemistry industry as well as that relative to pharmaceutical specialities were perfectly competitive, and on occasion, free. As we have commented, the scientific and commercial imbalance of Germany in the drugs sector was constructed on approaches of global chemical development, quite the contrary to the French case, where the drug industry held its own identity. The global results gave an advantage to Germany, making it capable of invading the world with new active pharmacological molecules and, the ability to adapt these industrial formats, both classic and modern. The experience and tradition of French pharmacy only gave it a certain *chance* in the market of finished products and in

those of inorganic basis. It showed deficits however and was dependent on their German 'enemies' for all the necessary raw materials with which to elaborate their chemical drugs.

The imbalance in this speciality is translated into the existence of a single factory of artificial dyestuffs, of French capital, capable of working from basic raw materials. We refer to *Société anonyme des matières colorantes et produits chimiques de Saint Denis*, founded in 1881, by merger of the *Poirrier* (1830) and *Dalsace* (1843). The rest of the French establishments could only deal with the manufacture of dyestuffs using intermediate products of Germanic origin; this is the case of *Fabrique de Couleurs d'aniline et Raffinerie de Beuzines Victor Steiner*, the *Fabrique de Produits chimiques et Matières colorantes Mabboux et Cammel* and the *Manufacture de Matières colorantes Laroche et Juillard*. To these four companies, we should also add the *Compagnie nationale de matières colorantes et de produits chimiques*, a national project, promoted by the *Syndicat national des matières colorantes*, in the same line as the *British Dyes* and with similarly ambitious aims.

Faced with a scarcity of purely French manufacturers, others were able to find a place, either by means of acquisition, or through implantation in French soil acting as subsidiary or branch of the large German and Swiss firms. They were only finalisation factories in which intermediate products were used coming from Germany, and susceptible to conversion into dyes with a simple chemical operation of transformation. In this way, the large German houses of dyestuffs obtained a double profit: outwitting customs norms which prohibited the entrance of any supposedly medicinal product either undeclared or not included in the pharmacopoeia, thus enabling the payment of reduced tariffs, applicable to raw materials not existing in French territory. Also, they continued to maintain their privileged situation by retaining, confined and protected, the procedures and techniques of fabrication in Germany.

But German colonisation was even more evident in the case of drugs ready made for consumption. In this case, the system used was that of the *prate-nom*, i.e French pharmaceuticals established in the country who prepared and/or sold drugs supplied by their German associates (25). The mechanism consisted in elaborating pharmaceuti-

cal specialities prepared from German associates, on French territory, thanks to the existence of these figureheads. These would then be sold in France and Germany as if they had been French prepared, in accordance with the Convention of Bern. The results were much more beneficial for the German industrialists, as they managed to export their merchandise and avoid their own pharmaceutical legislation which prevented them from selling drugs ready for consumption at another price other than the official tariff. Despite a notable expansion, in the form of chemical subsidiaries established in French soil and through *prête-noms* pharmaceuticals, France continued to carry an important weight in the drugs industry.

Contrary to what had happened with the German chemical drug industry, the French laboratories were, for the greater part, specifically pharmaceutical either in specialities or in chemical products and their qualified personnel included many medicals, biologists and pharmacists as well as the chemists and chemical engineers, also present in German industry.

As an answer to the triumphant apparition of tablets in the drug industry, French pharmacy was to concentrate its interest on another two new pharmaceutical forms: the soft gelatine capsules and the *cachets*. While the former responded to a pure industrialised model, which in the end would not last due to be unstoppable rise in hard gelatine capsules, the *cachets* arise as the most modern banner of the traditional pharmacy (26). With the advance of technology and the establishment of procedures of large scale drug manufacture in full swing, this pharmaceutical form, clearly homemade, and poorly adapted to wholesale production, appears.

Gelatine capsules were invented by the French pharmacist François Achille Barnabe Mothes in 1883, with the aim of disguising the medicinal substances of disagreeable organoleptic properties. The method invented by Mothes, was based on the immersion of ovoid metallic moulds in baths of liquid gelatine, a troublesome process, which required great manual skill and was not very productive. These limitations facilitated the development of new systems of encapsulation, more in accordance with industrial imperatives that began to be in vogue in most developed countries. The proposal of the French pharmacist Viel (1844) was in this context and constituted the first

really interesting variant since the invention of the new format. The basis of his technique relied on obtaining medicinal capsules by means of a simple mechanism, capable of elaborating cylindrical hollow bodies of gelatine by sliding them into a mould and in whose interior the medicinal substance was kept. These cylinders of gelatine could be submitted to capsular division thanks to the use of a cutting instrument specially designed for this operation. The perfection of the technique of capsular elaboration meant a truly gigantic step forward with the validation of a new French patent presented by Lavalle and Thévenot in 1846. The basis of this new method, clearly influenced by the procedure carried out two years before by the Italian Pegna, was the fabrication of capsules by interposition of the medical substance between two plates of solidified gelatine, fused by pressure of metal plates with holes (capsular moulds).

Parallel to the proposal of Thévenot was another developed and defended by yet another Frenchman, Jules César Lehuby; a new invention self-denominated as *Mes enveloppes médicamenteuses*, which would later be patented in France in October of 1846. Lehuby would describe these 'envelopes' as similar to the cocoons of silk worms, formed by two adjustable compartments one within the other until making a form like a cylindrical box capable of containing the required medical substance in its interior. The revolutionary invention of Lehuby, at that time known by the name of hard gelatine capsules, was modified by its author three consecutive times (1847-1850) with the aim of improvement. Despite the fact that Lehuby was really the inventor of the double compartmental gelatine capsules, other authors, principally from the Anglo-Saxon area, would concede the privilege of invention to the British James Murdoch, responsible for a patent for "an improved capsule or small care for protecting matters enclosed therein from the action of air, and an improved material to be used in their manufacture" (May 1848). Murdoch himself recognised, in the preamble to the text of his patent, that his contribution was not totally original: "it was communicated to me from abroad" (24). One of the possible reasons to explain this error of attribution, maintained by the greater part of the texts on the subject of gelatine capsules written at the end of the 19<sup>th</sup> century, and even today (27), was the scant repercussion that this type of preparation had during nearly 30 years following the publication of the first patents. The cap-

sules of hard gelatine were specially indicated as a support of solid medicines, which were less used at this time than the liquid forms and, therefore, only needed moderately high productions in order to profit from the construction of capsular moulds.

The amylaceous capsules made their appearance in France in the middle of the 19<sup>th</sup> century as a pharma-technical answer to certain problems of solubility that some covered pills represented. In 1853, the French man André Alexandre Guilliermond proposed a new pharmaceutical form which he called *enazyme*, as a result of closing a previously flattened pill, between two discs of unleavened bread approximately two centimetres in diameter and hollowed in the centre, which were then soldered by pressure after moistening the discoidal edges. The *enazyme* of Guilliermond did not have much repercussion in the pharmaceutical world until 20 years later. In 1873, Stanislas Limousin, also French, presented, first to the *Societe de Pharmacie de Paris* and later to the *Académie Nationale de Médecine*, a new pharmaceutical form, basically very similar to that proposed in 1853 by Guilliermond, which he named *cachets médicamenteux* (28). The Limousin's *cachets* were capable of hiding the disagreeable odours and tastes of some drugs, by avoiding the interactions of drug and excipient due to the absence of the latter. They could be used in a great number of drugs, due to the possibilities offered by the technical proposals for filling, closing and sealing that he had elaborated. The success of Limousin lay in generalising the elaboration of amylaceous capsules by the previous establishment of technological keys that would propitiate their existence, that is, while the *enazyme* of Guilliermond is only the final result of our specific pharmaceutical operation, the essential in the Limousin's idea is the pharmaceutical form, the *cachet*, usable, generally speaking, for any drug. The evolution of traditional pharmacy towards the drug industry had already begun.

Injectable vials was a particular and integrated pharmaceutical dosage form; the injectable were invented in 1886, by the French chemist Stanislas Limousin (29). Their magnificent reception among european pharmacists of the Mediterranean area was due to the handmade character of this pharmaceutical form and the artisan manner of carrying out this type of preparation. Perhaps for this, the name that has lasted has been that of the Latin root *Ampullae* and not that of *Amphiolen* or *Einschmelzgläser*, proposed by the German Pharma-

cy. The bottling and filling process of the medicinal liquid in the glass vial constitutes the most characteristic and definitive stage in the manufacture of injections, at least from the pharmaceutical point of view. We are faced with an operation, or group of operations, which are totally innovative for pharmaceutical procedure. We believe that the implantation and evolution of the different systems of filling marked a point in the progress of this pharmaceutical form, going from totally artisan practices to industrial procedures (30, 31).

#### 4. CONCLUSION

The therapeutic revolution of the 19<sup>th</sup> century was not lived in the same way in all countries; the economic social and cultural tradition, was key for interpreting the conceptual change that the discovery of natural active principles and the preparation of new synthetic remedies from bituminous coal, supposed. The Central European countries were very involved in the mechanisms and in the philosophy of the industrial revolution. Soon they were to control the fabrication of new drugs. The industry of alkaloids and that linked to organic synthesis of pharmacologically active molecules was very soon dominated by the countries of this area, especially by Germany, although other nations also played a part, namely Switzerland and England.

Although it is certain that with the synthesis of alkaloids, the launching of industrialised medication took off, the definitive backup was produced with the development of organic chemistry of pharmaceutical application. In the first case, the research protagonist is obviously therapeutic: the extraction of active principles is no more than an optimisation of classic medicinal material. In the second case, the drug is only a secondary product obtained or attainable from the procedures used in any chemical industry.

The 'innovative' scheme for drugs, generalised in Central European countries, follows general industrialisation guidelines; specific factories do not exist for their attainment but they are integrated into much more viable commercial and technological units such as those responsible for the elaboration of artificial dyestuffs. The chemical industry functions as a whole; each raw material used in a specific process may not be more than the product or waste of another. In these conditions,

the elaboration of chemical drugs cannot be improvised and has to be subject to a general industrial flow chart.

In this model, the pharmaceutical industry does not exist, at least understood as an easily identifiable sub-sector; the preparation of drugs is carried out in factories in which, in addition, explosives, dyestuffs, perfumes, photographic material are also elaborated. The birth of German or Swiss pharmaceutical industries is chemical; only those laboratories created as a result of the breakthrough with alkaloids, the cases of *Merk-Darmstad* or *Schering* are two good examples, originating in apothecaries, the rest proceeded from the evolution of other less specialized fabrication centres (*Agfa, Bayer, Hoescht, Ciba, Geigy, Sandoz*, etc.). The break through of new pharmaceutical forms and the application of French machinery would come later, when chemical infrastructure had already been consolidated, favouring the development of the pharmaceutical speciality more linked to the great chemical laboratory than to the professional collective of pharmacists.

The fundamental axis of the 'traditional' model is pharmacy, understood as a highly qualified profession but also as a scientific discipline on its own. This premise is extremely useful for understanding the principal characteristics of the pharmaceutical industry in the countries of southern Europe; its objective is medicine and this can never be a sub-product attainable as a result of ordinary processes of industrial chemistry. In these factories the drug is the protagonist and its preparation is, generally, the only line of possible activity in this type of laboratory.

For the large factories of German dyestuffs, medicines appear as the result of general chemical planning or as another object in a diversified superstructure in need of an adequate covering, of pharmaceutical form, for its commercialisation. For the French industries the covering is the final aim and the chemical substances are no more than raw materials with which to elaborate the end product. While the medicine industry in Central European countries is essentially, pharmaceutical chemical, that of the European Mediterranean countries tends towards pharmaceutical specialities and while the former depends on organic chemistry, the latter depends on pharmaceutical technology.

Laboratories of pharmaceutical specialities are born from the super-production of the chemist's shops at a time marked by the prescrip-

tion of specific generalised remedies for pathologically homogeneous populations. This would explain the movement of the Mediterranean pharmaceutical industry towards exclusively inter-professional capitalisations. The structures of their laboratories do not derive from Limited Companies, but family enterprises with pharmaceutical capital or arising from chemist's shops and directed commercially and technically by professionals of the drug business.

The decisive implication of the chemist in the Mediterranean area in the construction of the pharmaceutical industrial framework was key to the conformation of a model with its own identity, strongly participated by professional corporations and with the industrial solutions or recipes, exportable to modest pharmaceutical laboratories as well as proceeding from these, a mechanism of reciprocity which reminds us how originally the laboratory of pharmaceutical specialities was no more than a prolongation of the dispensary.

The industrialisation of medicines has been effected by two different models. Central European countries, involved themselves in the manufacture of large-scale pharmaceutical specialities taking advantage of the important advances in Chemistry and Technology. On the other hand, the Europe nations around the Mediterranean area, tried to accelerate and benefit from their traditional procedures of manual elaboration, using apparatus and machinery that, in general, only permitted the mechanisation of some of the productive stages.

The triumphant model was that of the Central European countries, essentially for its capacity to respond to the principal industrialisation criteria: mechanisation, re-productivity, profitability, wholesale elaboration, tendency to the implantation of a single productive process and the use of machinery of continuous function. Their most important innovations, tablets and hard gelatine capsules are today, two of the predominant pharmaceutical forms.

The model of the European-Mediterranean countries, although, on occasion, complying with some of the necessary conditions for large-scale fabrication, was never able to compete with the powerful English or German manufacturers. The idiosyncrasy itself of the French, Spanish or Italian pharmaceutical collective, more prone to individualised elaboration, would gag, limit and even cause the failure of its own industrialisation prospects. Its two main contributions, the soft

gelatine capsules and the amylaceous capsules disappeared from the therapeutic map. Only the injectable vials, due to the hybridisation of technologies between both models, have been able to survive.

<b>The 'innovative' model: Centro-European area</b>	<b>The 'traditional' model: European-Mediterranean area</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Countries: Germany, England, Switzerland.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Countries; France, Spain, Italy.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Basic chemical industry very developed, especially organic ones.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chemical industry little developed and the organic even less.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Highly capitalised firms and with great quantity of labour.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Few highly capitalised firms and abundance of labour.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inclusion of highly qualified salaried personnel.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deficient training in industrial chemistry: lack of qualified personnel.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Clear separation between the property (limited companies) and the technical management.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tendency towards inter-professional capitalisations: pharmaceutical capital. Separation between the owner of the productive centre and the technical management did not exist.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Integrated chemical industry: manufacture of dyestuffs, explosives photographic material, perfumes and medicines.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Typical industry of consumer goods: exclusive manufacture of drugs. Inexistence of a global industrial organigram.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inexistence of a pharmaceutical industry with own identity. Exception: the industry based on vegetable active principles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pharmaceutical industry with own identity. Place of manufacture: dispensaries, dependent and independent laboratories.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• The essential of the drug is its active pharmacological molecule; pharmaceutical form, the finished product, is no more than a covering.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• The 'covering' of the drug is the primordial aim, the active pharmacological substances are no more than raw materials.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• The execution of the hegemony through the industrial property: manufacturers brand marks for the chemical substances.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Industrial protection is effected through the trademark of the establishment or pharmaceutical speciality.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Secondary role of the pharmaceutical in the global industrialisation process. Principle protagonists: the investors and chemical engineers.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• The pharmaceutical is the protagonist of the industrialising process.</li> </ul>

*Continuous*

<b>The 'innovative' model: Centro-European area</b>	<b>The 'traditional' model: European-Mediterranean area</b>
• Use of high-performance machinery.	• Use of pseudo-industrial machinery.
• Adaptation of drugs to large-scale manufacture: tablets and gelatine capsules.	• Adaptation of the machinery to drugs.
• Tendency towards the mechanisation of all the productive stages and the implantation of machinery of continuous working.	• Mechanization only of some productive stages, discontinuity in the global process of manufacture.

**5. ACKNOWLEDGEMENT**

This investigation is financed by the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain): research project HAR 2009-09564.

**6. REFERENCES**

1. Weber, M. (1905) *Die protestantische Ethik und der 'Geist' des Kapitalismus*. Düsseldorf: Verl. Wirtschaft und Finanzen.
2. Rodríguez Nozal, R. & González Bueno, A. (2009) Instrumentos, utensilios, aparatos y procedimientos en las primeras etapas de la industrialización farmacéutica. In R. Rodríguez Nozal & A. González Bueno (coords.), *El medicamento de fabricación industrial en la España contemporánea* (pp. 173-223). Madrid: CERSA.
3. Rodríguez Nozal, R. (1998) La tecnología al servicio del medicamento: las formas farmacéuticas en el gozne de los siglos XIX y XX. In J. L. García Hourcade et al. (coord.), *Estudios de historia de las técnicas, la Arqueología industrial y las ciencias* (1, pp. 223-231). Salamanca: Junta de Castilla y León.
4. Rodríguez Nozal, R. & González Bueno, A. (2005) *Entre el arte y la técnica. Los orígenes de la fabricación industrial del medicamento*. Madrid: CSIC.
5. Travis, A. S. (1993) *The rainbow makers: the origins of the synthetic dyestuffs industry in Western Europe*. Bethlehem: Lehigh University Press / London: Associated University Presses.
6. Meyer-Thurrow, G. (1982) The industrialisation of invention: a Case study from the German chemical industry. *Isis*. 73(268): 363-381.
7. Arora, A., Landau, R. & Rosenberg, N. (eds.) (1998) *Chemicals and long-term economic growth: insights from the chemical industry*. New York / Chichester: Wiley.

8. Travis, A. S. *et al.* (ed.) (1998) *Determinants in the evolution of the European chemical industry 1900 to 1939 New technologies, political frameworks, markets and companies*. Dordrecht / Boston: Kluwer.
9. Goertz, G. (1990) *The world chemical industry around 1910. A comparative analysis by branch and country*. Geneva: Centre of International Economic History, University of Geneva.
10. Homburg, E., Travis, A. S. & Schröter, H. G. (eds.) (1998) *The Chemical industry in Europe, 1850-1914. Industrial growth, pollution and professionalization*. [Chemists and chemistry, 17]. Dordrecht: Kluwer.
11. Garnal, P. (1917) *L'Allemagne tentaculaire. L'industrie chimique en France et en Allemagne*. Lyon: Association typographique.
12. Haber, L. F. (1971) *The Chemical Industry 1900-1930. International Growth and Technological Change*. Oxford: Clarendon press.
13. Rousiers, P. (1924) *Les Grandes Industries modernes. V Les Industries chimiques. Le Régime légal des Ententes*. Paris: Libr. A. Colin.
14. Boas Hall, M. (1973) La croissance de l'industrie chimique en Grande-Bretagne au XIXe siècle. *Revue d'Histoire des Sciences*. 26: 49-68.
15. Richmond, L., Stevenson, J. & Turton, A. (eds.) (2003) *The Pharmaceutical industry. A guide to historical record*. Burlington: Ashgate.
16. Alexander, W. (1923) L'Industrie des colorants en Angleterre. *Revue Économique Internationale*. 15(3): 340-355.
17. Kebler, L. F. (1914) The tablets industry. It's evolution and present status. The composition of tablets and methods of analysis. *The Journal of the American Pharmaceutical Association*. 3(6): 820-848; 3(7): 937-958; 3(8): 1062-1099.
18. Wilkinson, L. (1971) William Brockedon, F.R.S. (1787-1854). *Notes and Records of the Royal Society of London*. 26: 65-72.
19. Rosenthal, I. (1872) Einen Apparat zur Compression voluminöser Arzneistoffe. *Sitzungsberichte der physikalisch-medicinischen Societät*. 4: 70.
20. Parascandola, J. (1985) Industrial Research Comes of Age: The American Pharmaceutical Industry, 1920-1940. *Pharmacy in History*. 27(1): 12-21.
21. Cowen, D. L. (1985) The On-going Pharmaceutical Revolution: The Role of the Industry. In F. J. Puerto (coord.), *Farmacia e Industrialización. Libro homenaje al Doctor Guillermo Folch Jou* (pp. 95-104). Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España.
22. Foote, P. A. (1928) Tablets. I. The Evolution of the tablet machine. II. A bibliography on tablets. *Bulletin of the University of Wisconsin*. 1566: 1-143.
23. Jones, B. E. (1987) The History of the Gelatine Capsule. In K. Ridgway (ed.) *Hard Capsules. Development and Technology* (pp. 1-12). London: Pharmaceutical Press.
24. Gunn, C. (1965) A History of Some Pharmaceutical Presentations. In F.N. Poynter (ed.). *The Evolution of Pharmacy in Britain* (pp. 131-149). London: Pitman Medical Pub. Co.
25. Garnal, P. (1914) La Pharmacie et la Thérapeutique françaises ne doivent pas être au service du commerce et de l'industrie chimique allemands. *Bulletin des Sciences Pharmacologiques*. 21(10-12): 202-211.

26. Rodríguez Nozal, R. & González Bueno, A. (1996) La répercussion des formes pharmaceutiques d'origine française à l'aube de l'industrialisation pharmaceutique espagnole. *Revue d'Histoire de la Pharmacie*. 312: 292-296.
27. Griffenhagen, G. B. (1957) *Tools of the apothecary*. Washington: American Pharmaceutical Association.
28. Limousin, S. (1873) Nouveau procédé d'administration des poudres médicamenteuses. Cachets médicamenteux. *Répertoire de Pharmacie*. 1: 5-6.
29. Limousin, S. (1886) Ampoules hypodermiques. Nouveau mode de préparation des solutions pour les injections hypodermiques. *Bulletin Général de Thérapeutique Médicale et Chirurgicale*. 110(7): 316-319 [also published in *Archives de Pharmacie*. 4: 145-147. 1886].
30. Stich, C. & Vörner, H. (1904) *Bakteriologie und Sterilisation im Apothekenbetrieb*. Berlin: Springer.
31. Cambronero, S. (1924) *Ampollas medicinales. Técnica de su preparación*. Madrid: Imprenta Colonial.

**\*Información de Contacto:**

Dr. Antonio González Bueno.

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Plaza Ramón y Cajal, s/n. 28040, Madrid.

e-mail: agbueno@farm.ucm.es

## El evolucionismo de Rodríguez Carracido. Nuevas consideraciones

Francisco Díaz-Fierros Viqueira\*

Catedrático de la Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.  
Encargado del Museo de Farmacia Gallega "Aniceto Charro".  
Recibido el 5 de diciembre de 2010.

### RESUMEN

Se presentan las teorías evolucionistas de José Rodríguez Carracido contenidas en sus trabajos *La evolución en la química* (1894) y "Filogenia química de la molécula albuminoidea" (1917). Se describen sus aspectos más singulares y originales en relación con el contexto científico de su época, la filosofía evolucionista de Spencer y las hipótesis de Crookes y Pfüger de la que se mostraba partidario. Se resalta el interés de estos trabajos en relación con la problemática de la introducción de las teorías evolucionistas en España, concluyendo que estos trabajos a pesar de algunos anacronismos y especulaciones representan una aportación coherente y valiosa para su tiempo.

**Palabras clave:** Evolucionismo; abiogénesis; génesis albuminoides.

### ABSTRACT

#### New insights into Rodríguez Carracido's evolutionism

This paper presents the evolutionary theories contained in José Rodríguez Carracido's works entitled *La evolución en la química* (1894) and "Filogenia química de la molécula albuminoidea" (1917). The most original aspects of his theory are put into the scientific context

of his time: Spencer's evolutionary philosophy and Crookes and Pflüger's hypothesis supported by him. The interest of these works regarding the problems arisen by the introduction the evolutionary theories in Spain is highlighted, coming to the conclusion that despite these works show some anachronisms and speculations, they represent a coherent and valuable contribution at that time.

**Keywords:** Evolutionism; biogenesis; albuminoid genesis.

## 1. INTRODUCCIÓN

El farmacéutico Rodríguez Carracido, profesor de la Facultad de Farmacia de Madrid y rector de la Universidad Central es citado con frecuencia como uno de los defensores del darwinismo en España (1, 2) haciendo referencia, sobre todo, a su polémica con el cardenal Cereferino González y en menor medida a la crónica que realiza sobre las enseñanzas de esta doctrina por González Linares en la Universidad de Santiago (3). Aspecto en el que coinciden también todos sus biógrafos (4-6). En el pasado año 2009, de conmemoraciones darwinianas, se vuelve a insistir sobre estos mismos puntos. Sin embargo, en todas estas referencias nada o muy poco se dice sobre la importancia de su libro *La evolución en la química* (1894) (7) y otros trabajos posteriores donde se realizan singulares aportaciones sobre el origen de los elementos y, sobre todo, de las moléculas albuinoideas y, a partir de ellas sobre la aparición de la vida sobre la tierra. Doctrina muy avanzada para su tiempo y posiblemente expuesta por primera vez en España por este insigne farmacéutico. Solamente un trabajo *on-line* de Catalá y Peretó (8) hace referencia a la singularidad de sus aportaciones sobre el origen de la vida, así como otro más reciente de Díaz-Fierros (9).

## 2. LA EVOLUCIÓN EN LA QUÍMICA

Fue publicado en 1894 por la Imprenta Viuda de Hernando de Madrid, cuando el autor contaba 38 años y era ya un reconocido catedrático de la Universidad Central. Este libro puede considerarse como la continuación de *La nueva química. Introducción al estudio de la*

*Química según el concepto mecánico* (1877) (10) donde se anticipan algunas ideas que aquí serían desarrolladas con mucha mayor amplitud. El objetivo fundamental de este nuevo libro sería la de aplicar las teorías evolucionistas de Spencer y Haeckel a los procesos químicos. Comienza con una llamada a la unidad en el conocimiento de la naturaleza, que concibe como un gran organismo donde todo se integra y, en consecuencia, critica *la prolijidad de la obra analítica* realizada en el siglo anterior que *hizo añicos* la posibilidad de alcanzar con su estudio una concepción unitaria. De lo que se deduce que *la unidad del Cosmos debe reflejarse en el terreno intelectual, integrando el particularismo de las supuestas ciencias en una sola ciencia*. Considera que el darwinismo fue el concepto unificador que realizó la gran síntesis en la biología y que algo similar podría hacerse en la química. Para lo cual establece un paralelismo entre los métodos de estudio de la química con los de la biología teniendo en cuenta que los últimos, ordenados desde un punto de vista evolutivo, seguirían la siguiente secuencia: Histología-Anatomía-Fisiología-Biología. En cuanto a la química esta secuencia se transformaría en esta otra: Histología química (unidades materiales de los procesos químicos)-Anatomía química (asociación de las masas moleculares)-Fisiología química (fuerzas de los procesos químicos)-Biología química (el proceso químico).

Con este esquema comienza Carracido a desenvolver los diferentes capítulos de su libro que concluyen, al final, con el planteamiento de las tesis más claramente evolucionistas. Una de ellas es la de la aplicación a la química de la ley biogenética fundamental de Haeckel de que “la ontogenia se recapitula en la filogenia”. Según esta interpretación serían *las transformaciones químicas producto de un verdadero proceso evolutivo subordinado a los mismos procesos fundamentales que rigen la evolución total de la naturaleza*. Es decir, que las reacciones químicas actuales (la “ontogenia química”) servirían de explicación de las transformaciones de la materia que tuvieran lugar en el pasado, sobre todo, las correspondientes a la cosmogénesis (la “filogenia química”).

En el capítulo donde desarrolla el concepto de ontogenia química introduce dos ideas fundamentales: que las reacciones químicas representan una especie de adaptación de unos principios que se consideraban inmutables —las afinidades químicas— a un medio cambiante

como serían el *conjunto de acciones físicas y mecánicas capaces de modificar el estado de los sistemas materiales*. La segunda idea, ya anticipada en *La nueva química*, tiene que ver con la ley periódica de los elementos que acababa de descubrir Mendeleiev. Esa organización que mostraban los elementos químicos, a pesar de algunas excepciones, era la manifestación de una especie de “familias naturales” que a su vez eran prueba de una ley natural que las regulaba y ordenaba, y sobre las que Carracido se expresa así: *Hasta los elementos inmutables del proceso químico se relacionan entre si por la variación rítmica de sus masas y sus propiedades, lo cual induce a suponerlos engendrados por un trabajo evolutivo*. Los elementos químicos representarían la parte inmutable de la materia —es decir “la herencia”— mientras que la adaptación de las reacciones químicas a un medio que cambia, serían los procesos que introducirían la variación. La estabilidad, definida por las diferentes formas de equilibrio químico, sería el camino a seguir por las transformaciones con más éxito evolutivo.

Carracido basaría su concepto de filogenia química en los descubrimientos que el análisis espectral acaba de aportar sobre la composición química del universo. Estos datos, que mostraban la existencia de cuerpos estelares con muy diferentes edades y con una composición química variable y relacionada con aquella, sugerían la idea de que los materiales más recientes estarían formados por elementos ligeros como el hidrógeno, nitrógeno o helio, mientras que los más pesados se localizarían entre los más viejos. Y así concluye: *Si la evolución siderea, como hoy se supone, se produce condensándose progresivamente la materia cósmica, desde la emergencia de la nebulosa que surge del éter indiferenciado hasta terminar en los astros sin atmósfera ¿no es lógico inferir la probabilidad de condensaciones paralelas de las substancias antes diferenciadas en el orden creciente de los pesos atómicos?* En este contexto plantea la génesis de los elementos químicos, según la hipótesis de W.Crookes —que ya la había considerado en *La nueva química*— a partir de una substancia primordial, el “protilo”, que por sucesivas diferenciaciones y condensaciones puede dar lugar a las variantes que presentan los elementos químicos. No es ajeno Carracido al carácter hipotético de estas teorías, pero que de todas formas no prescinde de ellas pues, en cierta manera, *todas las teorías nacieron así*.

Para enlazar estos procesos filogenéticos cósmicos con la ontogenia química, utiliza como analogía la síntesis de los minerales en ya-

cimientos con diferentes edades. En ellos, a partir de condiciones térmicas muy distintas de las actuales se va produciendo la diferenciación mineralógica con unas reacciones químicas similares a las que se reproducen en la actualidad en los laboratorios. Estas reacciones actuales podrían interpretarse como la ontogenia de los procesos químicos mientras que las reacciones que se producirían en la diferenciación mineralógica, en condiciones muy alejadas de las actuales y con una determinada secuencia temporal, representaría la filogenia química.

Termina el libro con una referencia a la ley de la evolución que Spencer enuncia en *Los primeros principios* (1862) (11) y que Carracido adapta de esta manera: *Los dos términos relacionados por Spencer, la integración de la materia ó, con mayor exactitud de masa, y la correlativa disipación del movimiento, transportándose respectivamente á la pura y exacta noción mecánica de masa, y á los trabajos de los agentes físico-mecánicos que sobre el campo de aquella evolucionan.* En resumen, que el antagonismo clásico entre materia y fuerza se resuelve por el mecanismo general de la integración progresiva de las masas con la disipación de los movimientos correspondientes a los trabajos físico químicos que precisan. Este concepto mecánico de la materia nos lleva al axioma final con el que concluye el libro: *reducese el Universo al proceso evolutivo de la Fuerza.* Es decir, traducido en el lenguaje actual, que “todo es energía”.

### 3. FILOGENIA QUÍMICA DE LA MOLÉCULA ALBUMINOIDE

Esta otra aportación de Carracido al evolucionismo desde España se presentó en su forma más elaborada en un trabajo publicado en la *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* (1917) (3) y, posteriormente en la *Revue Scientifique* (1920) (12) donde dio origen a una pequeña controversia. Previamente había publicado otros trabajos donde le había ido dando forma a su teoría. En ella desarrolla un tema que puede considerarse como una aplicación de su pensamiento evolucionista a una cuestión mucho más concreta pero de una gran transcendencia para explicar el origen de la vida sobre la tierra, como era la de la génesis de las proteínas a lo largo del proceso evolutivo.

Carracido, considerado como el primer bioquímico español, llevaba mucho tiempo estudiando las características químicas de las principales moléculas implicadas en los procesos biológicos cuando le llamó la atención el hecho de que la hemoglobina que, desde un punto de vista evolutivo puede considerarse una molécula moderna pues solo se presenta en los vertebrados, era también la que poseía en su núcleo el hierro, el elemento biogénico que tenía un número atómico más elevado. Esta circunstancia le hizo pensar en el paralelismo que podría existir entre el origen de los elementos químicos y el de las moléculas orgánicas. Por otra parte, la reacción de Michailow, característica de las moléculas albuminoideas, que tiene como base la polimerización y oxidación del ácido sulfocianico le hizo reparar en las teorías de Pflüger, de 1875 (13), sobre el origen de la materia viva. De acuerdo con ellas la sencilla molécula del ácido sulfocianico debió de ser, a lo largo de los procesos evolutivos, el núcleo principal que dio origen por polimerizaciones sucesivas a las complejas moléculas proteicas. Concluyendo en que en *la reacción de Michailow se produce artificialmente una metamorfosis química análoga a la que el desarrollo de la serie filogenético formó naturalmente la hemoglobina*. (*Formación natural de la hemoglobina*, 1906) (14).

Sobre estas bases, se formulaba esta cuestión fundamental: *La Biología viene preguntando con reiterada insistencia: ¿cómo se habrá formado el primer ser vivo no existiendo sus progenitores? Pero esta pregunta supone otra, cuya contestación debe preceder a la de aquella ¿cómo se formó la materia albuminoidea constitutiva del primer ser viviente?* Para intentar encontrar una respuesta a esta cuestión fundamental escribe Carracido su trabajo sobre la filogenia química de las moléculas albuminoides. En el desarrolla con detalle los argumentos anticipados en el trabajo de la hemoglobina sobre todo los relativos a la reacción de Michailow y las teorías de Pflüger. Pero también realiza aportaciones propias sobre los casos concretos de las reacciones específicas de formación de aminoácidos (arginina e histidina), de los polipéptidos y de las proteínas, de las bases pirimidínicas, de los ácidos proteicos, de la cromatina y de la hemoglobina.

Establecidas las reacciones fundamentales de formación de las moléculas biogénicas, en el contexto que Carracido definía como ontogenia química, restaban ahora por establecer algunas cuestiones relativas a las condiciones de formación en las que se desarrolló el proceso

filogenético de éstas moléculas. Sobre todo, en el caso de unas condiciones ambientales que permitieran la construcción de los grandes edificios moleculares así como del carácter ópticamente activo de las principales moléculas biogénicas. Para el primer caso especula con la mayor limpieza de la atmósfera en las épocas anteriores a la aparición de la vida lo que permitiría una mayor incidencia de la radiación ultravioleta sobre la tierra, que a su vez haría posible la síntesis de la molécula del *aldehído formador de la cianhidrina generadora del primer aminoácido*. En el segundo caso, justifica la síntesis asimétrica de las moléculas ópticamente activas por la acción del paleomagnetismo terrestre.

De todo esto concluye que: *Análogamente a la serie filogenético de los organismos que se desarrolla desde los unicelulares hasta los multicelulares de mayor diferenciación morfológica y fisiológica, debe admitirse otra serie filogenético química que, desde el término inicial de una sencilla combinación carbonitrogenada, vaya creciendo gradualmente hasta las proteínas y los proteidos de mayor magnitud molecular, articulando las piezas en el complejísimo mosaico.*

Al año siguiente a su publicación en la *Revue Scientifique* el gran químico austríaco, afincado en Italia, Giacomo Ciamician (de ascendencia armenia, nace en Trieste en 1857 y fallece en Bolonia en 1922, donde era profesor de su universidad. Propuesto nueve veces para el Nobel fue un gran especialista en fotoquímica siendo considerado el precursor de los paneles solares) le contesta en la misma revista. Inicialmente reconoce que varias de sus hipótesis presentan *un certain degré de vraisemblance*, sobre todo las relativas a la formación de los aminoácidos a partir de los aldehidos mediante la cianhidrina. Pero, en cambio, considera muy poco probable la formación de los compuestos ópticamente activos a partir del desdoblamiento de los productos racémicos por la acción de las fuerzas magnéticas o, incluso, de la rotación de la tierra.

Pero, donde centra sobre todo sus críticas es en la escasa estabilidad que deberían presentar los compuestos orgánicos formados bajo las condiciones que existían en la tierra cuando se formó la vida. Los compuestos orgánicos son generalmente poco resistentes al aire y la luz a no ser que estén adecuadamente protegidos bajo condiciones especiales. Situación que podría darse en los cuerpos micelares tipo cé-

lulas de Traube. Se podría pensar, continúa, *haciendo un poco de fantasía sobre éste término...que en células semejantes de naturaleza inorgánica se han desarrollado estos procesos que han dado nacimiento a las materias orgánicas y a la vida.*

Finalmente, considera que siendo el problema propuesto por Carracido “muy interesante” está en desacuerdo con las conclusiones a las que llega, inclinándose más por aceptar propuestas como las de Arrhenius según las cuales las moléculas orgánicas habrían existido siempre en el universo y de allí habrían alcanzado la tierra en un determinado momento previo a la formación de los seres vivos.

#### 4. DISCUSIÓN

El evolucionismo de Carracido es más spenceriano que darwinista, en el sentido de que se preocupa más de la evolución global del universo que de la particular de los seres vivos y, en este contexto, habría que situar sus trabajos sobre la evolución química y, sobre todo, los relativos al origen de la materia viva. Esta afiliación a la filosofía de Spencer, todavía muy acreditada en los medios científicos españoles de su tiempo (1) la reconoce ya el propio Carracido en sus *Confesiones* (1927) (15). En ellas, recuerda que fue en sus tiempos de estudiante compostelano cuando en 1874 conoció el pensamiento de Spencer a través de un discurso de Cánovas del Castillo, que lo impresionó *tan intensamente que, sin preocuparme la versatilidad, me reconocí su adepto.* Poco después adquiriría el *Sistema de Filosofía Sintética* de Spencer en el que estaba integrado sus *Primeros Principios*, obra que tan profundamente influiría después sobre sus trabajos de evolución química. Esta adscripción filosófica, en mayor o menor medida, no la abandonaría nunca en su vida y así lo reflejaba Valentí Camp en una biografía que había realizado de Spencer en 1922 (16): *En España la doctrina spencerina es relativamente conocida... y algunos de nuestros hombres de ciencia, como el ilustre Carracido y el venerable José Zulueta, entre otros, han propagado con verdadero entusiasmo el positivismo lógico.*

De sus trabajos relativos al evolucionismo, son los relacionados con el origen de la materia viva los que hoy merecen un mayor reconocimiento. Pues en ellos además de un planteamiento especulativo (casi inevitable en aquella época por las características de esta temá-

tica) existe también una sólida argumentación científica perfectamente homologable a la que se estaba desarrollando en la mayor parte de las grandes revistas científicas del momento. La temática relativa a la evolución química, en cambio y pese al interés y novedad de alguna de las hipótesis y razonamientos desarrollados, era meramente especulativa y también relativamente arriesgada y poco fundamentada científicamente por lo que pronto fue superada por nuevas aportaciones. También y como consecuencia de su aceptación del origen de los elementos a partir de la teoría de las condensaciones progresivas del protilo de Crookes (algo que también aceptaban Rodríguez Mourelo y otros químicos españoles de finales del XIX) era contrario a la existencia de los átomos (denominada como hipótesis de la *materia discontinua* que contraponía a la de la evolución continua de la materia, que él defendía) que ya por esta época comenzaban a encontrar sólidos y bien fundados argumentos de su realidad con los trabajos en los que Canizzaro y otros actualizaban las teorías pioneras de Dalton y Prout (17).

Sin tener muy claro en que momento Carracido comenzó a prescindir de estas teorías que negaban la individualidad del átomo hay que señalar que todavía Crookes a principios del XX interpretaba el descubrimiento del electrón por Thomson como una confirmación de su peculiar teoría: *el electrón sería el protilo cuyos variados agrupamientos produciría la génesis de los elementos* (18).

En relación con los estudios sobre el origen de la vida Carracido no tuvo la oportunidad de conocer el trabajo que Oparin publicó en ruso en 1924 ya que se difundió en occidente a partir de la edición inglesa de 1939 (19) ni el que Haldane publicó en 1929 (20). Con ellos, como es sabido, se establecieron las bases sobre las que se basan las teorías actualmente vigentes sobre el origen de la vida en la tierra. La época con la que convivió Carracido y que precedió a la de los descubrimientos anteriores se caracterizó en relación con dicha temática por la convivencia, casi siempre conflictiva, entre diferentes teorías lo que llevó, según opinión del propio Oparin a que estos estudios *adquieran un nuevo vigor en los comienzos del siglo veinte*.

Durante la mayor parte del XIX la teoría sobre el origen de la vida que mayor adhesiones subscribía era la de la generación espontánea o heterobiosis. Filósofos tan reconocidos como Hegel, Schelling y Oken

la utilizaban profusamente en sus obras. Científicos como el químico Gay-Lussac (1810) o naturalistas como Schwann (1837) o Schulze (1836) la defendían abiertamente y Pouchet publica en 1858 un voluminoso tratado con todos sus pormenores. Sin embargo Pasteur a partir de 1862 y después de publicar unos excelentes trabajos donde llamaba la atención, sobre todo, de los errores de método en los que incurrieran los defensores de la generación espontánea inició el principio del fin de esta teoría. Que, de todas formas pervivió, de forma residual hasta bien entrado el siglo XX en trabajos como los de Elfving (1938) o Lepeshinskaya (1945) (21).

Otra alternativa donde se mantenía el planteamiento vitalista era la de la panespermia o eternidad de la materia viva que suponía que esta siempre había existido por todo el universo, fertilizando los diferentes planetas (entre ellos la tierra) con gérmenes vitales aportados por la caída de meteoritos. Había nacido a finales del XIX a partir del descubrimiento de materia orgánica en los meteoritos y un número sorprendente de importantes científicos la había defendido, como el inglés Lord Kelvin (1871), el francés Van-Tieghen (1891) o el ruso Kostychev (1921). Incluso científicos de tanta transcendencia e importancia como el químico Arrhenius (1912) o el geoquímico Vernardsky (1924) apoyaban versiones particulares de esta teoría (21).

La otra teoría, de base mecanicista, denominada abiogénesis, proponía el origen de la materia viva a partir de la evolución de la materia mineral. Haeckel la había defendido sin mayores argumentos pero otros científicos habían intentado desarrollar diversas teorías que justificaban determinados procesos evolutivos de la materia compatibles con las supuestas condiciones físico químicas de la tierra en épocas pretéritas. En todas ellas existía siempre un agente físico-químico (luz ultravioleta, descargas eléctricas, energía química, temperatura, etc.) que inducía el proceso de síntesis de la materia viva.

En 1875 el biólogo alemán E. Pflüger (13) propuso como origen de la materia viva el radical CN que se podía sintetizar espontáneamente cuando compuestos nitrogenados se ponían en contacto con carbón al rojo blanco. Suponía que estas reacciones se producían cuando la tierra estaba incandescente y que posteriormente estos radicales cianógeno por sucesivas condensaciones podían dar lugar a los primeros aminoácidos. Esta teoría tenía demasiadas simplificacio-

nes y algunos supuestos básicos (como la distinción entre proteínas propias de la materia viva y de la materia muerta) no demostrables experimentalmente. Sin embargo Oparin considera que para su tiempo *esta teoría era muy progresista, y desempeñó un papel positivo en el desarrollo de nuestras ideas acerca del origen de la vida, ya que significaba un esfuerzo por explicar la síntesis primaria de los compuestos orgánicos.*

Carracido, tenía ciertas dudas sobre la teoría de Pflüger sobre la que decía en 1911 que *no puede tacharse de absurda tal suposición, pero todo en ella es completamente hipotético, y la honradez científica compele a declarar que nada se sabe respecto a la gestación química de la primera vida.* En la primera edición de su *Tratado de Química Biológica* (1903) (22) defiende que *el primer tránsito de la materia mineral a la orgánica es la reducción del anhídrido carbónico ... sobre la base de los hidrocarburos es fijado el nitrógeno, y según determinadas condiciones, el azufre, el fósforo, el hierro y los demás elementos biogénicos, constituyendo las complicadas moléculas formadoras de la materia viva,* hipótesis muy acreditada entre los defensores de un origen mecanicista de la vida. En la segunda edición de 1917 (22) se mantiene inalterada esta versión. Sin embargo, pocos años después, en 1920 (12), consideraba la hipótesis de Pflüger como el fundamento de sus propias teorías sobre el origen de las primeras proteínas. En este trabajo la aportación más original corresponde a las diferentes reacciones (todas confirmadas experimentalmente) en las que interviene el radical CN o compuestos relacionados como el cianhídrico, y que pueden considerarse formadoras de aminoácidos y proteínas. La propia hipótesis de la influencia del campo magnético terrestre sobre el origen de la actividad óptica de las moléculas biógenas, se apoyaba en una experiencia de Faraday de 1846, y por lo tanto resultaba plausible para la época.

En las últimas etapas de su vida, Carracido le da gran importancia a la formación de compuestos micelares como base de la matriz superficial imprescindible para un desarrollo eficaz de las reacciones biogénicas. Describe las experiencias, muy de moda en aquel momento, de crear artificialmente análogos celulares que por su morfología recordaban a las células, como las realizadas por Leduc (23) o el mexicano Herrera (24). Sin embargo, era muy consciente de la utopía que encerraban muchas de éstas experiencias de "biología sinté-

tica” haciendo suyas las palabras de J. Loeb *toda mezcla para ser considerada como viviente, ha de ser generadora de procesos automáticos de conservación, crecimiento y reproducción; la forma exterior es secundaria.*

En resumen, la obra de Carracido relacionada con el origen de la vida en su expresión más elemental de la formación de los primeros aminoácidos y proteínas puede considerarse para su época como coherente y progresista. Presenta algunos anacronismos y ciertas especulaciones de muy difícil demostración. ¿Pero qué científico de esa época y sobre esa temática no incurrió en algún momento en ellas? Los ejemplos de Kelvin, Arrhenius o Vernadsky, entre otros, son sobradamente expresivos. Por otra parte si utilizamos como criterio de evaluación de su obra el, tan actual, de considerar el “impacto” de las revistas en las que se publican sus trabajos, los nombres de las *Revue Scientifique*, *Revue general des Sciences*, *Scientia*, francesas, o *Biochemische Centralblatt*, alemana, deberían de ser suficientes para mostrar el reconocimiento internacional de su obra.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Núñez Ruíz, D. (1977) *La mentalidad positiva en España: Desarrollo y crisis*. Tucar Ediciones. Madrid.
2. Glick, Th. (1982) *Darwin en España*. Ed. Península. Madrid.
3. Rodríguez Carracido, J. (1917) Filogenia química de la molécula albuminoidea. *Rev. R. Ac. Ciencias*, XVI.
4. Fernández, O. (1929) *José R. Carracido. Recuerdos de su vida y comentarios de su obra*. Librería Médica N. Moya. Madrid
5. Sánchez-Moscoso, A. (1971) *José Rodríguez Carracido*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Madrid.
6. Moreno González, A. (1991) *José Rodríguez Carracido*. Fund. Banco Exterior. Madrid.
7. Rodríguez Carracido, J. (1894) *La evolución en la química*.
8. Catalá, J. I. & Peretó, J. G. (2002) Early Spanish Scientific Writings on the Origin of Life. <http://www.uv.es/orilife/textos/oaxaca02.pdf>
9. Díaz-Fierros, F. (2009) Científicos galegos no debate sobre o darwinismo en España. En *O Darwinismo e Galicia* (Ed. Díaz-Fierros, F.) (págs. 145-174). Universidade de Santiago. Santiago.
10. Rodríguez Carracido, J. (1877) *La nueva química*. Impr. y Libr. Nicolás Moya. Madrid.
11. Spencer, H. (2009) *Los primeros principios*. Ed. Comares. Granada.

12. Rodríguez Carracido, J. (1920) Clasificación biochimique des matieres albuminoïdes. *Rev. Scientifique*, jul, 23, pag. 114.
13. Pflüger. (1875) Uber die physiologische Verhrehnung in den lebenden Organismen. *Pflügers Arch.* 10: 251-267.
14. Rodríguez Carracido, J. (1906) Formación natural de la hemoglobina. *Rev. R. Ac. Ciencias.* IV.
15. Rodríguez Carracido, J. (1927) *Confesiones*. (Manuscrito inacabado). Ateneo de Madrid.
16. Valentí Camps, S. (1922) *Ideólogos, teorizantes y reveldes*. Ed. Minerva. Barcelona.
17. Papp, D. & Babini, J. (1958) *Panorama General de la Historia de la Ciencia. Tomo X: Las Ciencias Exactas en el siglo XIX*. Espasa-Calpe Argentina. Buenos Aires.
18. Comas Solá, J. (1906) *La Vanguardia*, 13.12.1906 (págs. 6-7).
19. Oparin, A. I. (1939) *The origin of life*. Dover. Nueva York.
20. Haldane, J. B. (1929) *The origin of life*. Rationalist Annual.
21. Oparin, A. I. (1970) *Origen de la vida sobre la tierra*. Ed. Tecnos. Madrid.
22. Rodríguez Carracido, J. (1903) *Tratado de Química Biológica* (Libr. Perlado, Madrid, 1903; 2ª ed. Libr. Suc. Hernando, Madrid, 1917; 3ª ed. Libr. Suc. Hernando, Madrid, 1924).
23. Leduc, St. (1912) *La Biologie synthétique*. París.
24. Herrera, A. (1911) *Une science nouvelle*. Méjico.

**\*Información de Contacto:**

Dr. Francisco Díaz-Fierros Viqueira.  
Catedrático de la Facultad de Farmacia.  
Facultade de Farmacia.  
Universidade de Santiago de Compostela.  
Aptdo. 15786.  
e-mail: francisco.diaz-fierros@usc.es



## La energía de activación como marcador de heterogeneidad enzimática: Utilidad en bioquímica clínica

José Carlos Tutor\*

Laboratorio Central, Hospital Clínico Universitario.  
Instituto de Investigación Sanitaria (IDIS). Santiago de Compostela.  
Recibido el 15 de diciembre de 2010.

### RESUMEN

La energía de activación ( $E_a$ ) puede proporcionar datos de interés en estudios de caracterización de la heterogeneidad enzimática, tanto para sistemas enzimáticos presentando verdaderas isoenzimas como formas moleculares de origen post-traducciona. En el presente artículo se hace una revisión bibliográfica de los datos previamente publicados para distintas enzimas de utilidad diagnóstica, como creatina kinasa,  $\alpha$ -amilasa, lactato deshidrogenasa, aspartato-amino-transferasa, fosfatasa alcalina,  $\gamma$ -glutamilttransferasa, 5'-nucleotidasa, alanino aminopeptidasa y  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa. Asimismo, se sugieren posibles líneas de investigación, en las que esta variable termodinámica podría proporcionar datos interesantes para otras enzimas con aplicación clínica.

**Palabras clave:** Energía de activación; heterogeneidad enzimática; creatina kinasa;  $\alpha$ -amilasa; lactato deshidrogenasa; aspartato aminotransferasa; fosfatasa alcalina;  $\gamma$ -glutamilttransferasa; 5'-nucleotidasa; alanino aminopeptidasa;  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa.

## ABSTRACT

### The activation energy as a marker of enzyme heterogeneity: Usefulness in clinical biochemistry

The energy of activation ( $E_a$ ) may provide interesting data in the studies of enzyme heterogeneity characterization, both for enzyme systems having true isoenzymes or molecular forms with a post-transcriptional source. In this article a bibliographical review is carried out on the previously published results for several enzymes with diagnostic usefulness, as the creatine kinase,  $\alpha$ -amylase, lactate dehydrogenase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase,  $\gamma$ -glutamyltransferase, 5'-nucleotidase, alanine aminopeptidase, and  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase. Likewise, possible investigation lines are suggested, in which this thermodynamic variable would to give interesting data for other enzymes with clinical usefulness.

**Keywords:** Activation energy; enzyme heterogeneity; creatine-kinase;  $\alpha$ -amylase; lactate-dehydrogenase; aspartate-aminotransferase; alkaline phosphatase;  $\gamma$ -glutamyltransferase; 5'-nucleotidase; alanine-aminopeptidase;  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase.

## 1. INTRODUCCIÓN

La magnitud termodinámica que determina si una reacción química tiene lugar espontáneamente es el cambio de *energía libre de Gibbs* ( $G$ ), que expresa la capacidad del sistema para realizar trabajo. Para que pueda tener lugar de forma espontánea la transformación química de un substrato  $S$  en un producto  $P$ , el  $\Delta G$  ( $GP-GS$ ) ha de ser negativo, es decir la energía libre asociada a  $P$  ( $GP$ ) debe ser menor que la asociada a  $S$  ( $GS$ ), determinando su magnitud las concentraciones relativas de  $S$  y  $P$  en el estado de equilibrio.

Según la teoría del estado de transición, la transformación de  $S$  en  $P$  tiene lugar a través de un estado intermedio de transición ( $S^*$ ), en equilibrio con  $S$  y presentando una energía libre mayor. A la diferencia entre la energía libre de  $S^*$  y  $S$ , se denomina *energía de activación* ( $E_a$ ), y constituye una barrera energética para el transcurso de la reacción entre  $S$  y  $P$ . Solo las moléculas de  $S$  que posean un exceso de

energía suficiente para salvar la barrera energética y llegar a  $S^*$ , pueden transformarse en  $P$ . Evidentemente, la proporción de moléculas de  $S$  capaces de cumplir este requerimiento es tanto mayor cuanto menor sea la  $Ea$  de la reacción.

Como cualquier catalizador, las enzimas aceleran las reacciones químicas disminuyendo la  $Ea$  asociada al estado de transición, lo que conduce a la existencia de un mayor número de moléculas de  $S$  con una energía suficiente para salvar la barrera energética de  $S^*$ . La determinación de la  $Ea$  aparente se basa en la dependencia de la actividad enzimática con la temperatura de acuerdo con la ecuación de Arrhenius (1):

$$\ln (U/L) = -Ea/RT + \ln A$$

siendo  $Ea$  la energía de activación aparente (kJ/mol),  $R$  la constante universal de los gases ( $8,3143 \times 10^{-3}$  kJ/mol x grado),  $T$  la temperatura absoluta (°K) y  $A$  el factor de colisión que se asume es constante para el intervalo 293-313 °K. En la parte lineal de la representación de  $\ln$  actividad ( $U/L$ ) frente al inverso de la temperatura ( $1/T$ ) puede calcularse la  $Ea$  aparente a partir de la pendiente ( $b$ ) de la ecuación determinada por regresión lineal:

$$-Ea/RT = b/T; Ea = -8,3143 \times 10^{-3} \times b \text{ (kJ/mol)}$$

La  $Ea$  es la barrera energética que debe ser superada para que la reacción tenga lugar, y consecuentemente una elevada  $Ea$  equivale a una baja actividad catalítica específica de la enzima (actividad por unidad de masa de proteína enzimática) (2).

Hace algunos años se concedió gran interés al estudio de la  $Ea$  de distintas reacciones enzimáticas con vistas a su posible relación con la adaptación bioquímica de las especies a las condiciones de temperatura del medio. Las enzimas de los animales de sangre fría son más eficientes para reducir la barrera energética (menor  $Ea$ ), que los sistemas enzimáticos homólogos de aves y mamíferos (3). En este sentido, para distintas especies de peces se ha descrito una correlación positiva significativa de la  $Ea$  de una ATPasa miofibrilar con la temperatura del medio en que habitan (4).

El estudio de la *Ea* ha proporcionado datos de interés, tanto desde un punto de vista académico como práctico, para distintas enzimas de utilidad diagnóstica y ampliamente utilizadas en la práctica clínica. A continuación se hace una revisión de los datos publicados al respecto.

## 2. CREATINA QUINASA (CK, EC 2.7.3.2)

La CK presenta localización mayoritariamente citosólica, con una estructura dimérica compuesta por subunidades polipeptídicas B (cerebro) y M (músculo). Se han caracterizado las tres isoenzimas posibles: CKBB (predominante en cerebro), CKMB (predominante en músculo cardiaco y esquelético) y CKMM (predominante en músculo esquelético). Modificaciones post-traduccionales conducen a una mayor heterogeneidad enzimática, con tres isoformas de la CKMM y dos de la CKMB. Las formas tisulares CKMM3 y CKMB2 son transformadas después de su cesión al plasma por la N-carboxipeptidasa circulante con formación de las isoformas CKMM2, CKMM1 y CKMB1.

Los estudios de Hagelauer y cols. (2, 5) pusieron de manifiesto una *Ea* creciente para las isoenzimas de la CK en orden CKMM (49 kJ/mol), CKMB (58 kJ/mol) y CKBB (62 kJ/mol), coincidente con su termolabilidad (2). En mezclas de isoenzimas CKMM y CKBB se encontró una adecuada concordancia entre los valores experimentales y los calculados para la *Ea* aparente (2), lo que permitiría estimar la proporción relativa de ambas isoenzimas en función de la *Ea*; sin embargo, el asunto se complica al considerar la posible presencia de la isoenzima CKMB con *Ea* de valor intermedio.

El envejecimiento *in vitro* en condiciones fisiológicas de pH durante 72 h a 37 °C de las isoenzimas CKMM y CKMB, condujo a una disminución de su actividad catalítica (inactivación) acompañada de un aumento gradual de sus *Ea*, sin que se produjesen cambios significativos para la concentración estimada de ambas isoenzimas (2). Consecuentemente, esta inactivación podría deberse a una disminución de la actividad catalítica específica resultado de la formación de una mezcla de formas enzimáticas más o menos inactivadas, y no de acuerdo con un proceso de inactivación del todo o nada (2).

En pacientes con infarto de miocardio la concentración estimada de CK total aumentó inicialmente en paralelo con la actividad catalítica, alcanzando el máximo aproximadamente 24 h más tarde, y disminuyendo después más lentamente (5). Así mismo, se encontró un aumento gradual de la  $E_a$  aparente desde un valor aproximado de 51 kJ/mol inmediatamente después del infarto hasta 68 kJ/mol tres días más tarde (5, 6), con un perfil coincidente con el obtenido en el estudio de inactivación por envejecimiento *in vitro* (5). El posible efecto de distintas proporciones de isoenzima CKMB con respecto a la CK total sobre la  $E_a$  aparente sería despreciable, debido a su pequeña actividad catalítica en relación a la isoenzima CKMM, por lo que el aumento de  $E_a$  se debería a modificaciones de la subunidad M (6). La CKMM cedida al plasma sería la forma nativa CKMM3 (49,8 kJ/mol), con una consiguiente transformación en CKMM2 (60.3 kJ/mol) y CKMM1 (67.5 kJ/mol) (6). La evolución de la actividad sérica de la CK en pacientes con infarto miocárdico, es el resultado de dos procesos: escape de la enzima al medio extracelular y su consiguiente inactivación, existiendo una correlación entre la concentración enzimática y la actividad catalítica únicamente en la fase inicial post-infarto (5).

Delanghe y cols. (7), encontraron que en las 4-72 h post-infarto, la actividad específica de la isoenzima CKMB disminuía desde 0.88 U/ $\mu$ g hasta 0.71 U/ $\mu$ g, al tiempo que la  $E_a$  aumentaba desde 53,4 kJ/mol hasta 66,5 kJ/mol. Este incremento de la  $E_a$  es compatible con la desnaturalización de esta isoenzima después de su cesión al plasma; sin embargo, la disminución de la actividad específica es menor que la esperable en función del aumento de  $E_a$  observado, y posiblemente debido a cambios conformacionales en la molécula CKMB (7).

La CK contiene restos de manosa, galactosa, N-acetil-glucosamina, y ácido siálico. Como demostraron Langlois y cols. (8), las formas glucosiladas de la CK sérica presentan una  $E_a$  significativamente mayor que las formas no glucosiladas (105.6 kJ/mol vs 58.1 kJ/mol). Asimismo, la glucosilación de la CK cardiaca y muscular se asocia con un aumento de  $E_a$ , existiendo una correlación significativa de la unión relativa de la CK a las lectinas concanavalina A ( $r = 0.911$ ) y *Ricinus communis* ( $r = 0.912$ ) con la  $E_a$  (8). La presencia de restos ácido siálico y sulfato contribuyen a la estabilidad de la molécula de CK, y el tratamiento de las muestras con neuraminidasa o

sulfatasa conduce a una disminución de la actividad catalítica CK, con aumento de la *Ea* y de la unión a la lectina *Ricinus communis* (8). De acuerdo con Langlois y cols. (9), la *Ea* de la CK sérica presentaría una disminución transitoria en el curso de las primeras 12 horas post-infarto miocárdico o trauma muscular, debido a la pérdida de la porción glucídica de las formas enzimáticas tisulares durante su transporte a la circulación. A esta disminución inicial de la *Ea*, seguiría un progresivo aumento de la *Ea* en función del envejecimiento de la enzima circulante, de acuerdo con el concepto general de desnaturalización de enzimas tisulares después de su cesión al medio extracelular (2, 5).

Con el término “macroenzimas” se denomina a formas enzimáticas séricas presentando una masa molecular mucho mayor que la correspondiente enzima normalmente encontrada en condiciones fisiológicas o fisiopatológicas (9, 10). Estas formas macromoleculares pueden formarse por asociación de la enzima con inmunoglobulinas, generalmente IgG o IgA y solo ocasionalmente IgM (macroenzimas tipo 1), o por asociación con otros componentes séricos (lipoproteínas, fragmentos membranas celulares...) o incluso polimerización de la propia molécula enzimática (macroenzimas tipo 2). Como estas formas macromoleculares son aclaradas mucho más lentamente que las correspondientes enzimas, se acumulan en plasma y la aumentada actividad catalítica puede conducir a una interpretación diagnóstica errónea. Este hecho concede gran interés a la detección y caracterización de macroenzimas en el laboratorio clínico.

Se ha descrito la posible formación de macroenzimas tanto de tipo 1 como de tipo 2 para la CK. La macro-CK tipo 1 es un complejo con inmunoglobulinas, mientras que la más infrecuente macro-CK tipo 2 es probablemente la forma oligomérica de la enzima mitocondrial, detectada en el suero de pacientes con intensa degradación tisular de origen tumoral (11). La prevalencia de elevada actividad CK debida a macro-CK tipo 1 es de aproximadamente el 2%, habiéndose recomendado para su detección sistemática la precipitación con polietilén-glicol relativamente específica para complejos de enzimas con inmunoglobulinas (11).

Ambos tipos de macro-CK pueden ser reconocidos en suero humano mediante cromatografía de exclusión, pero no diferenciados entre

sí. Stein y cols. describieron un procedimiento para diferenciar los tipos de macro-CK basado en sus diferentes  $E_a$  (12). Para la macro-CK tipo 1 (CKBB-IgG) encontraron una  $E_a = 53$  kJ/mol, semejante a la CKBB ( $E_a = 58$  kJ/mol). Para la macro-CK tipo 2 encontraron una  $E_a = 142$  kJ/mol, semejante a los valores obtenidos para la CK mitocondrial de corazón (142 kJ/mol) y músculo esquelético (130 kJ/mol). La comparación de los resultados obtenidos en 22 sueros normales, 31 macro-CK tipo 1 y 25 macro-CK tipo 2, permitió a estos autores concluir que, tras la obtención por inactivación térmica (20 min a 45 °C) de una actividad catalítica residual  $> 50\%$ , una  $E_a < 75$  kJ/mol indicaría una macro-CK tipo 1, mientras una  $E_a > 75$  kJ/mol una macro-CK tipo 2 (12).

### 3. $\alpha$ -AMILASA (AMIL, EC 3.2.1.1)

La AMIL es una endoglicosidasa que forma parte de la secreción exocrina del páncreas y las glándulas salivales. Presenta dos isoenzimas, la pancreática (AMILP) y la salival (AMILS) codificadas por dos genes distintos, si bien se pueden encontrar diferentes formas moleculares para cada una de las dos isoenzimas, como resultado de modificaciones post-traduccionales (desaminaciones, glicosilaciones o deglicosilaciones).

Hafkenschied y Hessels encontraron una considerable variación para la  $E_a$  aparente de la AMIL sérica al utilizar distintos sustratos, y sugirieron que a esta variabilidad podría contribuir la distinta proporción relativa de isoenzimas (13). En efecto, estos autores encontraron en 12 sueros unos valores medios para las  $E_a$  de la AMIL total de 40.7 kJ/mol, para la AMILP de 44.8 kJ/mol y para la AMILS de 38.1 kJ/mol (13). Las  $E_a$  obtenidas para las isoenzimas séricas son análogas a las de las formas tisulares purificadas AMILP (45.0 kJ/mol) y AMILS (40.1 kJ/mol) (14). El hecho de que no se encontrase una diferencia significativa entre las  $E_a$  de las isoenzimas séricas y las formas tisulares purificadas, demuestra la buena estabilidad de la AMIL en el compartimento plasmático. Aunque la  $E_a$  de la AMILP es significativamente mayor que la de AMILS, la magnitud de esta diferencia no permitiría la evaluación termodinámica de la proporción relativa de ambas isoenzimas en suero.

#### 4. LACTATO DESHIDROGENASA (LDH, EC 1.1.1.27)

La LDH es una oxidorreductasa localizada en la fracción citosólica de prácticamente todos los tejidos del organismo. La molécula LDH es un tetrámero de 4 cadenas polipeptídicas de tipo H (corazón) y M (músculo), lo que conduce a la existencia de 5 isoenzimas LDH1 (HHHH), LDH2 (HHHM), LDH3 (HHMM), LDH4 (HMMM) y LDH5 (MMMM). La LDH1 y LDH2 son predominantes en músculo cardíaco, riñón y eritrocitos y la LDH5 en hígado y músculo esquelético, presentando otros órganos y tejidos distribuciones isoenzimáticas intermedias.

Los resultados de Buhl y cols. (15) evidencian una distinta *Ea* para las isoenzimas LDH1 y LDH5, sin embargo, al menos en nuestro conocimiento, este hecho no ha sido aún utilizado como marcador de la heterogeneidad enzimática de la LDH sérica en condiciones clínicas en que interese discriminar el predominio del homotetrámero HHHH o del MMMM.

#### 5. ASPARTATO AMINOTRANSFERASA (AST, ED 2.6.1.1)

La AST es una enzima ampliamente distribuida en los distintos tejidos del organismo, siendo particularmente abundante en hígado, músculo esquelético y corazón. Presenta dos isoenzimas, una de localización citosólica (ASTcit) que es mayoritaria en suero, y otra mitocondrial (ASTmit), cuyo aumento en suero indica un daño parenquimatoso severo.

Rej y Vanderlinde (16) pusieron de manifiesto que las isoenzimas tisulares humanas purificadas ASTcit y ASTmit presentan igual *Ea* (52.3 kJ/mol), un valor análogo al de la AST sérica (50.6 kJ/mol), sin que la adición de piridoxal fosfato al medio de reacción tenga efecto sobre los diagramas de Arrhenius obtenidos para la AST total o sus isoenzimas purificadas. Estos resultados imposibilitan la utilización de la *Ea* para el estudio de la composición isoenzimática de la AST. Se ha descrito la presencia en suero de complejos macromoleculares de la AST con inmunoglobulinas; sin embargo, no parece probable que la determinación de la *Ea* tenga un interés práctico para la detección de macro-AST circulante.

## 6. FOSFATASA ALCALINA (FAL, EC 3.1.3.1)

La FAL, como la  $\gamma$ -glutamyltransferasa, 5'-nucleotidasa y alanino aminopeptidasa (impropiamente denominadas de forma colectiva "enzimas de tracto biliar"), está ligada por anclajes hidrofóbicos a las membranas plasmáticas celulares. La FAL constituye una familia de numerosas formas enzimáticas, algunas de ellas verdaderas isoenzimas codificadas por genes distintos, mientras otras son el resultado de diferentes modificaciones post-traduccionales que conducen a una gran variedad de isoformas. Las formas de origen intestinal y placentario son verdaderas isoenzimas, mientras la FAL de origen hepático, biliar, óseo y renal son isoformas derivadas de una sola isoenzima.

Copeland y cols. (17) encontraron unas diferencias muy discretas entre las *Ea* de la FAL sérica de 29 pacientes y las isoenzimas purificadas de hígado, intestino y placenta. Por su parte, Langlois y cols. (18), en un estudio sobre la heterogeneidad post-traduccionales de la FAL ósea en suero, encontraron una correlación significativa de la actividad específica (U/ $\mu$ g proteína-enzimática) con la actividad sérica (U/L) en grupos de controles ( $n = 14$ ,  $r = 0.832$ ), pacientes con osteoporosis ( $n = 26$ ,  $r = 0.761$ ) y pacientes con hipertiroidismo ( $n = 78$ ,  $r = 0.572$ ), lo que sugiere una dependencia de la actividad enzimática específica con el grado del recambio metabólico óseo. Así mismo, la *Ea* en el grupo control (37,7 kJ/mol) fue significativamente menor que en los grupos de pacientes con osteoporosis (63.3 kJ/mol) o con hipertiroidismo (58.5 kJ/mol). En individuos clínicamente sanos, la eliminación de los residuos de ácido siálico de la molécula enzimática mediante incubación con neuraminidasa, condujo a un aumento gradual de la *Ea* desde 38,0 kJ/mol a valores de 57.0 kJ/mol, 66.1 kJ/mol y 75.3 kJ/mol después de 1 h, 2 h y 3 h de incubación respectivamente (18). Estos resultados sugieren la existencia de una heterogeneidad de la forma ósea de la FAL (¿distinto grado sialilación?) en enfermedades del metabolismo óseo, que se traduce en una menor calidad catalítica de la enzima, con menor actividad enzimática específica y mayor *Ea*.

## 7. $\gamma$ -GLUTARILTRANSFERASA (GGT, EC 2.3.2.2)

La GGT es una enzima ligada a membranas y presente en muchos órganos, sin embargo, se considera que su actividad sérica es mayo-

ritariamente de origen hepático. Aunque no se han caracterizado verdaderas isoenzimas genéticamente determinadas, esta enzima presenta una gran heterogeneidad con numerosas isoformas resultado de variaciones en la porción glucídica de la molécula, o la formación de formas macromoleculares por unión a lipoproteínas, e incluso a fragmentos de membranas celulares.

Aunque se han descrito aumentadas concentraciones séricas de asialoglicoproteínas en pacientes con enfermedad hepática, los cambios de la unión de la GGT a distintas lectinas sugieren una activa hiperglicosilación de la molécula enzimática (19, 20). Delanghe y cols. (19, 20) encontraron un aumento significativo de la *Ea* de la GGT sérica en distintas enfermedades hepáticas (exceptuando obstrucción extra-hepática) en relación a un grupo clínicamente sano, sin que existiese una correlación significativa de la *Ea* con la actividad enzimática. Sin embargo, el solapamiento de la *Ea* entre los distintos grupos de pacientes no permite su utilización en el diagnóstico diferencial. El tratamiento de muestras patológicas con neuraminidasa para eliminar los restos terminales de ácido siálico de la molécula GGT, condujo a una disminución significativa de la *Ea*. Así mismo, las formas enzimáticas ricas en ácido siálico, separadas por cromatografía de afinidad, presentaron una *Ea* significativamente mayor que las formas pobres en ácido siálico (19).

## 8. 5'-NUCLEOTIDASA (5'NU, EC 3.1.3.5)

La 5'NU es también una enzima localizada en las membranas citoplásmicas celulares y ampliamente distribuida en el organismo, aunque su actividad sérica se considera mayoritariamente de origen hepático. La heterogeneidad de la 5'NU sérica resulta de la unión de la enzima a lipoproteínas y a fragmentos de membranas plasmáticas, y a la variabilidad de su porción glucídica, pero no presenta verdaderas isoenzimas.

Utilizando distintos sustratos se obtuvieron diferentes valores para la *Ea* de la 5'NU (21), de modo análogo a lo señalado para otras enzimas (13, 17). En enfermedades hepatobiliares se ha descrito un aumento de la sialilación de la 5'NU sérica, que tendría como resultado un menor aclaramiento de la enzima por los receptores hepato-

citarios (21). En un grupo de pacientes con enfermedad hepática los valores obtenidos para la *Ea* de la 5'NU sérica utilizando inosina-5'-monofosfato como sustrato, son significativamente mayores que en individuos sanos (67.8 kJ/mol vs 59.2 kJ/mol), y el tratamiento con neuraminidasa de las muestras produjo una disminución significativa de la *Ea* de la 5'-NU en el grupo de pacientes hasta 63.6 kJ/mol ( $p < 0.001$ ), pero no en los controles sanos (56.7 kJ/mol) (21). Estos resultados confirman un aumento del grado de sialilación de la molécula de 5'NU en pacientes con enfermedad hepática.

## 9. ALANINO AMINOPEPTIDASA (AAP, EC 3.4.11.2)

La AAP es una enzima ligada a membranas con una amplia especificidad de sustrato, y frecuentemente denominada leucina aminopeptidasa que es realmente otra aminopeptidasa de localización citosólica (LAP, 3.4.11.1). Como se indicó anteriormente, FAL, GGT, 5'NU y AAP, constituyen un grupo de enzimas membranarias (impropiamente denominadas “enzimas de tracto biliar”), que presentan un comportamiento similar en el curso de la enfermedad hepática y alcanzan sus mayores actividades séricas en casos de colestasis intra- y extra-hepática.

La heterogeneidad enzimática de la AAP es debida a distintas modificaciones post-traduccionales de su molécula. La forma nativa anfifílica de la AAP puede pasar al plasma, especialmente en condiciones de colestasis, formando complejos de alta masa molecular con lipoproteínas o con fragmentos de membranas celulares.

En un grupo de pacientes con enfermedad hepatobiliar la *Ea* de la AAP sérica fue significativamente mayor que en el grupo control (62.1 kJ/mol vs 55.7 kJ/mol) (22). El tratamiento de las muestras con neuraminidasa o triton X-100 no produjo una variación significativa de la *Ea*, lo que indica que el grado de sialilación, o la formación de agregados de alta masa molecular (que serían disociados por el detergente) no afecta a la *Ea* de la AAP (22). Así mismo, la incubación durante 9 días en condiciones fisiológicas de pH y temperatura de un pool de sueros de pacientes con distintas enfermedades hepatobiliares, no produjo una variación significativa de la actividad enzimática o la *Ea* de la AAP (22). Estos resultados demuestran la buena estabilidad de esta enzima en el

medio extracelular; y descartan que el aumento de *Ea* en la enfermedad hepatobiliar sea debido a que un aclaramiento disminuido conduzca al envejecimiento de las isoformas circulantes AAP.

La eliminación con papaína de la parte hidrofóbica de la molécula anfifílica nativa de la AAP, conduce a una forma enzimática solubilizada de carácter hidrofílico, igual que la isoforma "normal" sérica presente en individuos sanos. En pacientes con enfermedad hepatobiliar, isoformas hidrofílicas más o menos proteolizadas pueden coexistir con los agregados de alta masa molecular de la forma anfifílica. El tratamiento con papaína de muestras de estos pacientes condujo a una progresiva disminución de la *Ea* de AAP, alcanzando al cabo de 8 horas de incubación valores análogos a los encontrados en individuos sanos (22). Estos resultados sugieren que la mayor *Ea* de la AAP sérica en pacientes con enfermedad hepatobiliar, se debería a la presencia de la forma nativa anfifílica, mientras en individuos sanos la forma enzimática circulante sería la hidrofílica.

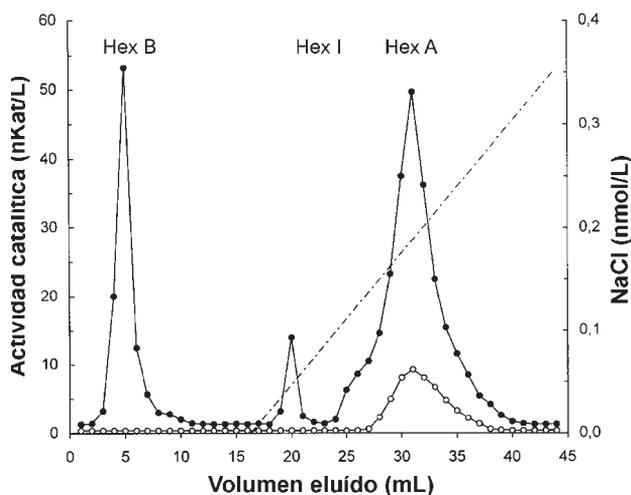
En un grupo los pacientes con enfermedad hepática (n = 30) se obtuvieron elevados coeficientes de correlación entre las actividades séricas de FAL (previa exclusión de la isoforma ósea), GGT, 5'NU y AAP ( $p < 0.001$ ). Así mismo, se encontraron correlaciones significativas entre las *Ea* de FAL y GGT ( $r = 0.472$ ,  $p < 0.005$ ), y de GGT y 5'NU ( $r = 0.613$ ,  $p < 0.001$ ) (22). La elevada significación de la correlación entre las *Ea* de GGT y 5'NU es esperable, teniendo en cuenta el análogo efecto del grado de sialilación de la molécula sobre la *Ea* de ambas enzimas. En el caso de la FAL, en nuestro conocimiento, no se ha estudiado aún el posible efecto de la sialilación sobre la *Ea* de la forma hepática, pero su correlación con la de GGT fue asimismo significativa, lo que permite suponer que podría tenerlo. Con respecto a la AAP, el factor determinante de su *Ea* parece ser la proteólisis parcial de la molécula, lo que justifica su falta de correlación significativa con las *Ea* de GGT y 5'NU, a pesar de sus semejanzas bioquímico-estructurales y de localización subcelular.

## 10. $\beta$ -N-ACETIL-HEXOSAMINIDASA (HEX, EC 3.2.1.52)

La Hex es una enzima lisosómica compuesta de dos tipos de cadenas polipeptídicas, denominadas subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , y codificadas por

dos genes diferentes. Las dos isoenzimas principales son el heterodímero  $\alpha\beta$  (isoenzima Hex A) y el homodímero  $\beta\beta$  (isoenzima Hex B), mientras el homodímero  $\alpha\alpha$  (isoenzima Hex S) es inestable y generalmente presenta muy limitada actividad catalítica. Otras formas enzimáticas puestas de manifiesto cromatográficamente, como la Hex P, cuya actividad sérica aumenta en el embarazo y en la enfermedad hepática, así como las denominadas formas intermedias (Hex I), derivarían de la isoenzima Hex B por modificaciones post-traduccionales.

En la Figura 1 se indican los resultados obtenidos en el fraccionamiento cromatográfico en DEAE-celulosa de las isoformas de la Hex en un lisado de fibroblastos, utilizando el derivado neutro de la metil-umbeliferona que es hidrolizado por las isoenzimas Hex A y Hex B, y el derivado sulfatado (negativo), específico de la subunidad  $\alpha$  y por tanto hidrolizado únicamente por Hex A. La termolabilidad de la isoenzima Hex A es significativamente mayor que la de Hex B, hecho ampliamente utilizado en la evaluación no separativa de la composición isoenzimática de la Hex.



**Figura 1. Fraccionamiento cromatográfico en DEAE-celulosa de las isoformas de la  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa (Hex) en un lisado de fibroblastos utilizando los substratos 4-metilumbeliferil-2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido (●) y 4-metilumbeliferil-2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido-6-sulfato (○).**

El estudio de la *Ea* aparente de la Hex sérica utilizando el sustrato cromogénico 3,3'-diclorofenolsulfoftaleinil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosamínido, puso en evidencia una correlación altamente significativa de esta variable termodinámica con la proporción relativa de isoenzima Hex B ( $r = 0.957$ ,  $p < 0.001$ ), con una ecuación de regresión  $Hex\ B\ (\%) = 3.0\ Ea - 125.3$ . Asignando al porcentaje de Hex B los valores extremos 0 y 100 se obtuvo un valor estimado para la *Ea* de Hex A de 41.8 kJ/mol y de Hex B de 75.1 kJ/mol, con una diferencia altamente significativa ( $p < 0.001$ ) entre ambos valores (23). Esta *Ea* estimada para la isoenzima Hex B es análoga a la obtenida para la forma Hex P purificada de placenta humana, cuya desialilación con neuraminidasa no produjo un cambio significativo de *Ea* o actividad catalítica. Así mismo, en distintos sueros de pacientes en que se había inactivado térmicamente la isoenzima Hex A, se obtuvo un valor medio para la *Ea* aparente de 75.2 kJ/mol (análoga a la de isoenzima Hex B), sin que el tratamiento con neuraminidasa produjese un cambio significativo de esta variable. Sin embargo, para la isoenzima Hex A purificada de placenta humana se obtuvo una *Ea* de 54.4 kJ/mol, significativamente mayor que el valor previamente estimado para esta isoenzima (41.8 kJ/mol). Este hecho podría explicarse teniendo en cuenta la conversión parcial de la Hex A tisular purificada en Hex B por reordenamiento de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , un hecho bien documentado en la bibliografía, y que en este caso fue confirmado electroforéticamente (23).

El hecho de que la *Ea* de Hex B sea mucho mayor que la de Hex A, debido a la presencia en esta isoenzima de la subunidad  $\alpha$ , posibilita la determinación termodinámica de la composición isoenzimática de la Hex en distintos medios biológicos, tales como suero/plasma, orina, y lisados celulares. La única diferencia entre la isoenzima Hex B y la forma Hex P es que esta tiene un mayor contenido de restos de ácido siálico en su molécula, presentando ambas formas igual *Ea*. Las denominadas formas intermedias (Hex I), presentando distintos grados de sialilación, tendrían *Ea* análogas a la isoenzima de que deriven (mayoritariamente Hex B). El cálculo de la *Ea* de la Hex permite la determinación simple y precisa de su composición isoenzimática en muestras de suero/plasma, siendo los resultados muy concordantes con los obtenidos por inactivación térmica de la Hex A, o utilizando los sustratos fluorogénicos derivados de la 4-metil-umbe-

liferona neutro (actividad enzimática total) y sulfatado (actividad isoenzima Hex A) (23).

Algunos metabolitos urinarios de baja masa molecular producen una interferencia positiva en la determinación de la  $Ea$  de la Hex, y consecuentemente en la proporción de isoenzima Hex B, lo que obliga a una eliminación previa de estos metabolitos utilizando membranas de permeabilidad selectiva para la aplicación del método termodinámico a la determinación de las isoenzimas de la Hex en muestras de orina (23). En un estudio posterior se caracterizó a la urea como el metabolito urinario capaz de interferir en la determinación de la  $Ea$  de la Hex (24).

La adición de urea a distintas muestras de orina, en las que previamente se habían eliminado los componentes de baja masa molecular ( $< 7.5$  kDa), puso de manifiesto un incremento lineal en paralelo de la  $Ea$  aparente de la Hex y la concentración de urea adicionada de acuerdo con ecuaciones de regresión de tipo:  $Ea = bU + Ea_o$ , en donde  $U$  es la concentración de urea y  $Ea_o$  corresponde a la  $Ea$  aparente en ausencia de urea. A medida que  $Ea_o$  (y por tanto la proporción relativa de Hex B) aumenta, las pendientes ( $b$ ) de las ecuaciones de regresión disminuyen gradualmente (24), existiendo una correlación negativa altamente significativa entre ambas variables ( $r = -0.960$ ,  $p < 0.001$ ). A partir de estos resultados, fue posible deducir una expresión matemática que permite el cálculo de la  $Ea$  en ausencia de urea ( $Ea_o$ ) en función de la  $Ea$  aparente obtenida para una muestra particular de orina presentando una concentración  $U$  de urea:  $Ea_o = Ea - (78.0 - Ea/100.0 - U)U$ . Este valor estimado de  $Ea_o$  puede ser utilizado para la determinación de la proporción relativa de isoenzima Hex B sin necesidad de la eliminación previa de urea en las muestras de orina (24).

Las gangliosidosis GM2 son enfermedades neurodegenerativas de carácter autosómico recesivo, caracterizadas por una incapacidad para metabolizar el gangliósido GM2, que en condiciones fisiológicas normales es hidrolizado por la isoenzima Hex A. Se pueden diferenciar tres tipos de gangliosidosis GM2 en las que están implicadas distintas mutaciones del gen que codifica la subunidad  $\alpha$  y asociadas a una deficiencia de isoenzima Hex A (variante B) conocida como enfermedad de Tay-Sachs, o mutaciones del gen que codifica la subuni-

dad  $\beta$  asociadas a una deficiencia de isoenzimas Hex A y Hex B (variante 0) conocida como enfermedad de Sandhoff, o mutaciones del gen que codifica el activador proteico GM2 necesario para la degradación del gangliósido GM2 y presentando actividades normales de las isoenzimas Hex A y Hex B (variante AB).

Los análisis enzimáticos son ampliamente utilizados para el diagnóstico bioquímico de pacientes homocigotos y la detección de portadores heterocigotos de las variantes A y 0 de gangliosidosis GM2, siendo más difícil el diagnóstico bioquímico de la variante AB. La determinación de la *Ea* aparente permite la evaluación simple y precisa de la heterogeneidad isoenzimática de la Hex en lisados de plaquetas, leucocitos totales, y poblaciones de leucocitos mononucleares y polimorfonucleares (25, 26), constituyendo una alternativa válida a los métodos clásicos de inactivación térmica de la Hex A, la utilización conjunta de los sustratos florogénicos neutro y sulfatado (específico para Hex A), e incluso a las técnicas separativas electroforéticas o cromatográficas. El uso de lisados de leucocitos totales no parece introducir un aumento significativo de la variabilidad interindividual de la proporción relativa de isoenzima Hex A, con respecto a la obtenida en lisados de poblaciones celulares homogéneas (plaquetas, leucocitos mononucleares, o leucocitos polimorfonucleares), siendo esta variable la más utilizada para el diagnóstico bioquímico de pacientes homocigotos y detección de portadores heterocigotos para la enfermedad de Tay-Sachs (26).

La enfermedad de Tay-Sachs presenta dos variantes enzimológicamente diferentes, la variante B clásica con ausencia de isoenzima Hex A, y la variante B1 con presencia de una isoenzima Hex A *mutada* inactiva frente al gangliósido GM2 y sustratos artificiales con carga negativa, debido a una disfuncionalidad catalítica del centro activo de la subunidad  $\alpha$ . Sin embargo esta isoenzima Hex A *mutada* es aparentemente normal frente a sustratos artificiales neutros convencionales, lo que imposibilita la utilización de métodos de inactivación térmica para el diagnóstico bioquímico de la variante B1 (27).

La isoenzima Hex A *mutada* separada por cromatografía en DEAE-celulosa del plasma de un paciente homocigoto de gangliosidosis GM2 variante B1 para la mutación R178H (G533 $\rightarrow$ A, Arg $\rightarrow$  178His), generalmente referida como "DN-alelo", presenta una *Ea* (71.5 kJ/mol) sig-

nificativamente mayor que la obtenida para isoenzima Hex A *normal* (41.3 kJ/mol) de controles sanos (28). Para la isoenzima Hex A *mutada*, la actividad catalítica sobre el sustrato cromogénico utilizado dependería exclusivamente del centro activo de la subunidad  $\beta$ , presentando una *Ea* análoga a la encontrada para la isoenzima Hex B (73.8 kJ/mol). Los padres del paciente presentaron un valor medio para la *Ea* de la isoenzima Hex A de 55.4 kJ/mol (28), sugiriendo la presencia de una mezcla equimolecular de isoenzimas Hex A *mutada* y *normal* en el plasma de los portadores heterocigotos para la mutación R178H. Estos resultados permitieron la puesta a punto de un protocolo para la identificación bioquímica de pacientes homocigotos y portadores heterocigotos para la variante B1 de gangliosidosis GM2 mediante la estimación de la proporción relativa de isoenzima Hex A en poblaciones leucocitarias (29).

Los estudios de Sá Miranda y cols. han puesto de manifiesto la elevada prevalencia de la mutación R178H en Portugal (30-32), y los resultados obtenidos en Galicia, una región con particulares lazos históricos con Portugal, apuntan asimismo a una alta prevalencia de esta mutación (27, 29, 33). En estudios posteriores se han descrito varios casos de pacientes homocigotos para la mutación R178H en Brasil (34) e Italia (35). Estos datos confieren un especial interés al estudio de esta enzimopatía en América Latina.

De forma análoga a otras enzimas lisosómicas, la Hex es sintetizada en forma de precursores de alta masa molecular ( $M_r \approx 150$  kDa) catalíticamente activos, que sufren una serie de procesos proteolíticos y de glucosilación antes de ser internalizadas en los lisosomas donde se encuentran como formas maduras con menor masa molecular ( $M_r \approx 120$  kDa); sin embargo, una pequeña proporción de formas enzimáticas precursoras (5-20%) es secretada al medio extracelular. La proteólisis parcial con papaína de la Hex plasmática (formas precursoras) condujo a un aumento de la *Ea* aparente, debido a un incremento de la *Ea* de aproximadamente 3.0 kJ/mol para la isoenzima Hex A, sin que se modifique el valor de la *Ea* de Hex B (36). Por otra parte, la digestión con papaína no modificó de forma significativa la *Ea* aparente de la Hex en muestras de orina o lisados de leucocitos y plaquetas (formas enzimáticas maduras). Estos resultados *in vitro* no permiten concluir que se incremente la *Ea* de Hex A durante los procesos de maduración e internalización en los lisosomas. En pacientes con

distintas nefropatías, presentando normo, micro y macroalbuminuria, no se encontraron incrementos significativos para la *Ea* de Hex urinaria durante la incubación con papaína. Estos resultados confirman la hipótesis de que, incluso en pacientes con proteinuria, no pasarían a la orina formas enzimáticas de origen plasmático, siendo la actividad Hex urinaria exclusivamente de origen renal (36).

Los resultados obtenidos por Hultberg y cols. en modelos experimentales demuestran que los cationes  $\text{NH}_4^+$  producen una inhibición en la maduración de los precursores de alta masa molecular de la Hex, interfiriendo en su transporte a los lisosomas, lo que conduce a una aumentada de la secreción al medio extracelular de formas enzimáticas recientemente sintetizadas (37, 38). Consecuentemente estos autores especulan sobre el posible efecto del aumento de amonio en la enfermedad hepática sobre la secreción de Hex al plasma, al tiempo que una mayor inactivación de la Hex A circulante podría explicar la aumentada proporción en suero/plasma de Hex B en pacientes con hepatopatías (37, 38).

En un grupo de pacientes con cirrosis hepática, el estudio de la composición isoenzimática de la Hex plasmática mediante la determinación de la *Ea* aparente, demostró una elevada correlación de la actividad catalítica y la proporción relativa de isoenzima Hex B con la concentración de amonio (39). La incubación de muestras de plasma durante 50 horas en condiciones fisiológicas de pH y temperatura, condujo a una inactivación gradual de la Hex sin modificación significativa de la *Ea* aparente en las primeras 7 horas de incubación, indicando que las isoenzimas Hex A y Hex B sufren una inactivación análoga durante este periodo de tiempo (39). Para tiempos de incubación mayores de 7 horas, se produjo un significativo aumento de la *Ea* aparente debido a una mayor inactivación de Hex A, sin embargo la actividad residual de las isoenzimas Hex A y Hex B nunca presentó una diferencia mayor del 20% (39). Esta diferencia de estabilidad de las isoenzimas Hex A y Hex B es menor que la descrita en estudios realizados en cultivos celulares (37, 38). En todos los casos, las proporciones relativas de las isoenzimas Hex A y Hex B calculadas a partir de la *Ea* aparente fueron muy concordantes con las obtenidas por un método de inactivación térmica de la Hex A. Estos resultados sugieren que la inactivación por envejecimiento de la Hex plasmática no puede ser explicada en función de la formación de moléculas en-

zimáticas parcialmente inactivadas con mayores  $E_a$  y menores actividades catalíticas específicas. La inactivación de la Hex plasmática parece ser un proceso de todo o nada, en el que moléculas catalíticamente activas coexisten con moléculas totalmente inactivadas. Como la vida plasmática media de la Hex humana tras ser infundida en la circulación del ratón es aproximadamente de 2-4 horas (40), y aunque estos datos no puedan ser totalmente extrapolados a los pacientes humanos, no parece que la aumentada proporción de isoenzima Hex B plasmática en la enfermedad hepática se deba a una mayor inactivación de la Hex A circulante. En cultivos celulares las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  son sintetizadas en cantidades similares, pero la asociación  $\beta\beta$  (Hex B) se realiza a mayor velocidad (41), cuya secreción al plasma en este caso sería favorecida por las aumentadas concentraciones de amonio.

En la Tabla 1 se hace una síntesis de los datos antes indicados sobre la heterogeneidad de las distintas enzimas consideradas, así como del interés alto medio o bajo del correspondiente estudio de su  $E_a$  aparente.

A modo de conclusión podría señalarse que los estudios termodinámicos de heterogeneidad enzimática constituyen una línea de investigación que de ningún modo puede considerarse agotada, y capaz de proporcionar futuros resultados de interés bioquímico clínico. Como ejemplo podría sugerirse dos casos concretos de posible aplicabilidad de este tipo de estudios:

La colinesterasa plasmática (pseudocolinesterasa, EC 3.1.1.8) presenta amplia heterogeneidad enzimática, con 7-12 fracciones electroforéticas que difieren en su masa molecular y que parecen ser agregados moleculares de una misma unidad básica. De mayor interés son variantes atípicas (aleloenzimas), caracterizadas por una disminuida actividad catalítica y afinidad por distintos sustratos. El estudio de la  $E_a$  podría contribuir a una mejor caracterización de estas variantes de enzimáticas.

La actividad oxidásica de la ceruloplasmina (ferroxidasa I, EC 1.16.3.1) deriva de la reducción de los átomos de cobre localizados en el centro activo de su molécula. La disminución de las reservas de cobre conduce a un aumento de la proporción relativa de *apoceruloplasmina* desprovista de actividad enzimática, así como otras formas em-

Tabla 1. **Tipo heterogeneidad enzimática e interés estudio energía de activación**

<b>Enzima</b>	<b>Heterogeneidad</b>	<b>Interés <i>Ea</i></b>
Creatina quinasa	3 isoenzimas (BB, MB, MM), distintas isoformas, macroenzimas tipo 1 y 2	Alto
$\alpha$ -Amilasa	2 isoenzimas (tipo salivar y pancreático), distintas isoformas, macroenzimas tipo 1	Bajo*
Lactato deshidrogenasa	4 isoenzimas (HHHH, HHHM, HHMM, HMMM, MMMM)	¿
Aspartato aminotransferasa	2 isoenzimas (mitocondrial y citosólica), macroenzimas tipo 1	Bajo*
Fosfatasa alcalina	3 isoenzimas (intestinal, placentaria y hepática/biliar/ósea/renal), distintas isoformas, macroenzimas tipo 2	Medio
$\gamma$ -Glutamyl transferasa	distintas isoformas, macroenzimas tipo 1 y 2	Medio
5'-Nucleotidasa	distintas isoformas, macroenzimas tipo 2	Medio
Alanino aminopeptidasa	distintas isoformas, macroenzimas tipo 2	Medio
$\beta$ -N-acetil-hexosaminidasa	3 isoenzimas ( $\alpha\alpha$ , $\alpha\beta$ , $\beta\beta$ ), distintas isoformas	Alto

\* En nuestro conocimiento aún no se ha estudiado la posible caracterización de macroenzimas mediante la determinación de su *Ea* aparente.

pobrecidas en cobre y disminuida actividad oxidásica específica en relación a la *holoceruloplasmina*. La actividad oxidásica específica de la ceruloplasmina no es influenciada en adultos por la edad, sexo, anticonceptivos orales o procesos inflamatorios, y se ha propuesto como un indicador sensible del status de cobre (42). La *Ea* aparente de reacciones de oxidación de  $Fe^{2+}$  o distintas aminas aromáticas catalizadas por la ceruloplasmina, podría presentar una relación inversa con la actividad oxidásica específica de la ceruloplasmina circulante, constituyendo un posible marcador de deficiencia de cobre.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Arrhenius, S. (1974) Über die reaktionsgeschwindigkeit bei der inversion von rohrzucker durch säuren. *Z. Phys. Chem.* 27: 913-15.
2. Hagelauer, U. & Faust, U. (1982) The catalytic activity and activation energy of creatine kinase isoenzymes. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 20: 633-38.
3. Low, P. S., Bada, J. L. & Somero, G. N. (1973) Temperature adaptation of enzymes: roles of the free energy, the enthalphy, and entropy of activation. *Proc. Nat. Acad.* 70: 430-32.
4. Cornish-Bowden, A. (2002) Enthalpy-entropy compensation: a phantom phenomena. *J. Biosci.* 27: 121-26.
5. Hagelauer, U., Faust, U., Trendelenburg, C., Kruse-Jarres, J., Rudolph, T. & Both, A. (1983) Determination of activation energy of creatine kinase isoenzymes. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21: 874-76.
6. Wevers, R. A., Hagelauer, U., Stein, W. *et al.* (1985) Indices for the age of the creatine kinase M-chain in the blood. *Clin. Chim. Acta.* 148: 197-210.
7. Delanghe, J. R., De Mol, A. M., De Buyzere, M. L., De Scheerder, I. K. & Wieme, R. J. (1990) Mass concentration and activity concentration of creatine kinase isoenzyme MB compared in serum after acute myocardial infarction. *Clin. Chem.* 36: 149-53.
8. Langlois, M. R., Delanghe, J. R., De Buyzere, M. L. & Leroux-Roels, G. G. (1992) Glycation of human tissue and serum creatine kinase. *Clin. Chim. Acta.* 211: 83-92.
9. Remaley, A. T. & Wilding, P. (1989) Macroenzymes: biochemical characterization, clinical significance, and laboratory detection. *Clin. Chem.* 35: 2261-70.
10. Turecky, L. (2004) Macroenzymes and their clinical significance. *Bratisl. Lek. Listy.* 105: 260-63.
11. Fahie-Wilson, M. N., Burrows, S., Lawson, G. J., Gordon, T., Wong, W. & Dasgupta, B. (2007) Prevalence of increased serum creatine kinase activity due to macro-creatine kinase and experience of screening programmes in district general hospitals. *Ann. Clin. Biochem.* 44: 377-83.
12. Stein, W., Bohner, J., Steinhart, R. & Eggstein, M. (1982) Macro creatine kinase: determination and determination of two types by their activation energies. *Clin. Chem.* 26: 19-24.
13. Hafkenschied, J. C. M. & Hessels, M. (1988) Some thermodynamic parameters and temperature-conversion factors for determining  $\alpha$ -amylase concentration in serum. *Clin. Chem.* 34: 2016-18.
14. Hafkenschied, J. C. M. & Hessels, M. (1989) Some thermodynamic parameters of pancreatic and salivary  $\alpha$ -amylase in serum. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 27: 173-74.
15. Buhl, S. N., Jackson, K. Y., Lubinski, R. & Vanderlinde, R. E. (1977) Optimal conditions for assaying human lactate dehydrogenase by the lactate-to-pyruvate: Arrhenius relationships for lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 5. *Clin. Chem.* 23: 1289-1295.
16. Rej, R. & Vanderlinde, R. E. (1981) Effects of temperature on the steady-state kinetics and measurement of aspartate aminotransferases. *Clin. Chem.* 27: 213-19.

17. Copeland, W. H., Nealon, D. A. & Rej, R. (1985) Effects of temperature on measurement of alkaline phosphatase activity. *Clin. Chem.* 31: 185-90.
18. Langlois, M. R., Delanghe, J. R., Kaufman, J. M., De Buyzere, M. L., Van Hoecke, M. J. & Leroux-Roels, G. G. (1994) Posttranslational heterogeneity of bone alkaline phosphatase in metabolic disease. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 675-80.
19. Delanghe, J., De Buyzere, M., de Scheerder, I. & Wieme, R. (1988) Measurement of activation energy of gamma-glutamyltransferase as a marker for enzyme heterogeneity. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 26: 271-76.
20. Delanghe, J. R., de Buyzere, M. L., de Scheerder, I. K., Faust, U. & Wieme, R. J. (1989) Activation energy and lectin affinity chromatography of gamma-glutamyltransferase as a marker for enzyme heterogeneity. *Clin. Biochem.* 22: 115-19.
21. Sogo, T., Gigirey, M. D. & Tutor, J. C. (1994) Activation energy of serum 5'-nucleotidase as marker for enzyme heterogeneity. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 32: 905-908.
22. Perez, L. F., Gigirey, D., Torío, S. & Tutor, J. C. (1998) Activation energy of serum alanyl aminopeptidase as a marker for enzyme heterogeneity in hepatobiliary diseases. *Clin. Chem. Enzymol. Commun.* 8: 91-101.
23. Perez, L. F. & Tutor, J. C. (1998) Assay of  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase isoenzymes in different biological specimens by means of determination of their activation energies. *Clin. Chem.* 44: 226-31.
24. Perez, L. F. & Tutor, J. C. (1998) Assay of  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase isoenzymes in urine by means of determination of their activation energies without removing endogenous low-molecular-mass components. *Clin. Chim. Acta.* 277: 39-49.
25. Casal, J. A., Chabás, A. & Tutor, J. C. (2003) Thermodynamic determination of  $\beta$ -hexosaminidase isoenzymes in mononuclear and polymorphonuclear leukocyte populations. *Am. J. Med. Gent.* 116A: 229-33.
26. Casal, J. A., Cano, E. & Tutor, J. C. (2005)  $\beta$ -hexosaminidase isoenzymes profiles in serum, plasma, platelets, and mononuclear, polymorphonuclear and unfractionated total leukocytes. *Clin. Biochem.* 38: 938-42.
27. Tutor, J. C. (2004) Biochemical characterization of the GM2 gangliosidosis B1 variant. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37: 777-83.
28. Pérez, L. F., Ribeiro, H. M., Casal, J. A., Pinto, R. A., Sá Miranda, M. C. & Tutor, J. C. (1999) Thermodynamic characterisation of the mutated isoenzyme A of  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase in GM2 gangliosidosis B1 variant. *Clin. Chim. Acta.* 285: 45-51.
29. Casal, J. A., Pérez, L. F. & Tutor, J. C. (2003) Thermodynamic determination of plasma and leukocyte  $\beta$ -hexosaminidase isoenzymes in homozygote and heterozygote carriers for the GM2 gangliosidosis B1 variant. *Am. J. Clin. Pathol.* 119: 684-88.
30. Teixeira, C. A., Sena-Esreves, M., Lopes, L., Sá Miranda, M. C. & Ribeiro, M. G. (2001) Retrovirus-mediated transfer and expresión of  $\beta$ -hexosaminidase  $\alpha$ -chain cDNA in human fibroblasts from GM2-gangliosidosis B1 variant. *Hum. Gen. Ther.* 12: 1771-83.
31. Dos Santos, M. R., Tanaka, T., Sá Miranda, M. C., Ribeiro, M. G., Maia, M. & Suzuki, K. (1991) GM2-gangliosidosis B1 variant: analysis of  $\beta$ -hexosaminida-

- se  $\alpha$ -gene mutations in 11 patients from a defined region in Portugal. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 886-90.
32. Pinto, R., Caseiro, C., Lemos, M. *et al.* (2004) Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur. J. Hum. Genet.* 12: 87-92.
  33. Eiris, J., Chabás, A., Coll, M. J. & Castro-Gago, M. (1999) Fenotipo infantil tardío y juvenil de la variante B1 de gangliosidosis GM2. *Rev. Neurol.* 29: 435-38.
  34. Rozenberg, R., Kok, F., Burin, M. G. *et al.* (2006) Diagnosis and molecular characterization of non-classic forms of Tay-Sachs disease in Brazil. *J. Child. Neurol.* 21: 540-44.
  35. Montalvo, A. L. E., Filocamo, M., Vlahovicek, K. *et al.* (2005) Molecular analysis of the HEXA gene in Italian patients with infantile and late onset Tay-Sachs disease: detection of fourteen novel alleles. *Hum. Mut.* 26: 282.
  36. Hermida, J., Casal, J. A. & Tutor, J. C. (2003) Effect of partial proteolysis on the activation energy of  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase precursor and mature forms. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41: 302-5.
  37. Hultberg, B., Isaksson, A., Nordström, M. & Kjellström, T. (1993) Release of  $\beta$ -hexosaminidase isoenzymes in cultured human fibroblasts. *Clin. Chim. Acta.* 216: 73-79.
  38. Hultberg, B., Floren, C. H., Isaksson, A. & Bruge, M. (1995) Liver disease and serum hexosaminidase levels. Studies in human hepatoma cell-line (HepG2 cells). *Liver.* 15: 99-103.
  39. Pérez, L. F., Casal, J. A., Rojas, P. & Tutor, J. C. (2000) Relationship between plasma ammonia concentration and  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase isoenzyme activities in liver cirrhosis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 38: 1237-41.
  40. Isaksson, A., Hultberg, B. & Jonung, T. (1992) Rat plasma clearance rate and organ distribution of  $\beta$ -hexosaminidase isoenzymes from human serum. *Clin. Chem.* 38: 1893-98.
  41. Neufeld, E. F. (1989) Natural history and inherited disorders of a lysosomal enzyme  $\beta$ -hexosaminidase. *J. Biol. Chem.* 264: 10927-30.
  42. Milne, D. B. (2001) Trace elements. En: "Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry" (Burtis, C. A. & Ashwood, E. R. ed.), Fifth Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia; 568-83.

**\*Información de Contacto:**

Dr. José Carlos Tutor.

Laboratorio Central, Hospital Clínico Universitario.

Instituto de Investigación Sanitaria (IDIS).

15786. Santiago de Compostela.

e-mail: josecarlostutor@redfarma.org



## **La fecundación in vitro, premio Nobel en Fisiología o Medicina 2010**

**Juan-Ramón Lacadena Calero**

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

El 4 de octubre de 2010, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska de Estocolmo decidió otorgar el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2010 al fisiólogo Robert G. Edwards “por el desarrollo de la fecundación in vitro”. En este caso, el título de Premio Nobel “en Fisiología o Medicina” responde perfectamente a la doble realidad porque el área científica del galardonado es la Fisiología y su investigación ha tenido gran repercusión en la Medicina.

Robert G. Edwards, nació en 1925 en Batley, Inglaterra. Desmovilizado del Ejército al término de la Segunda Guerra Mundial, decidió estudiar Biología en la Universidad de Bangor, Gales del Norte, y fue al cabo de varios años de su carrera, en 1951, cuando se dio cuenta de que se había equivocado en la vocación inicial hacia la Agricultura porque, según sus propias palabras, no sentía un interés especial por las semillas de trigo, de cebada o de avena y, menos todavía, por la cantidad que es preciso plantar, para conseguir un rendimiento óptimo, en cada acre de tierra. Entonces decidió pasarse al Departamento de Zoología pues se sentía más interesado por la “simiente animal” —es decir, por los óvulos y los espermatozoides— que por las semillas de plantas. Su desconcierto inicial se materializó en unos exámenes poco brillantes y en una graduación sin mención honorífica alguna. Aconsejado por un amigo, decidió solicitar la admisión para seguir un curso de postgrado en Genética Animal en la Universidad de Edimburgo, Escocia, que impartía el famoso profesor Waddington experto en Embriología y Genética. A pesar de su poco brillante expediente y con gran sorpresa por su parte, fue admitido en el Instituto

de Genética Animal. Allí cambió su destino científico porque en 1955 se doctoró con una tesis sobre el desarrollo embriológico del ratón bajo la supervisión de Alan Beatty. Su trabajo experimental lo realizó en “la casa de los ratones” de Douglas Falconer, uno de los pioneros mundiales en Genética Cuantitativa. Después de una estancia de un año en California, en 1958 se trasladó al National Institute for Medical Research en Londres y en 1963, tras una corta estancia en la Universidad de Glasgow, fue al Physiological Laboratory de la Universidad de Cambridge, de donde es Profesor Emérito.

Como antecedentes científicos hay que mencionar que los primeros estudios del proceso de fecundación in vitro en mamíferos se remontan a 1935 cuando Pincus estableció las condiciones experimentales que permitían la maduración in vitro de los ovocitos de coneja (1). Un cuarto de siglo después, en 1959, Chang (2) obtuvo embriones viables de conejo tras la fecundación in vitro de ovocitos madurados in vitro que daban lugar a descendencia viable al ser transferidos al útero. Aunque al principio se creyó que era necesaria la activación (capacitación) de los espermatozoides in vivo (dentro del útero de la hembra), sin embargo se demostró en hámster que los espermatozoides podían ser capacitados en medios adecuados in vitro sin necesidad de una activación in vivo (3).

Como se ha mencionado anteriormente, el galardonado Dr. Edwards estuvo trabajando durante varios años en la década de 1950 en Edimburgo en temas de fisiología reproductiva del ratón, especialmente en la maduración de ovocitos. Por ello, su formación era la adecuada cuando al final de la década de los 50 se le encargó en el National Institute for Medical Research de Londres que desarrollara un método que pudiera aliviar el problema de la infertilidad humana.

Para afrontar con éxito el proceso de fecundación in vitro en la especie humana había que solucionar varios problemas: 1) controlar el proceso de maduración de los ovocitos, 2) conseguir extraer los ovocitos en el estadio de desarrollo adecuado para la fecundación, 3) activar (capacitar) los espermatozoides in vitro, 4) definir las condiciones experimentales que promueven la fecundación y las primeras etapas del desarrollo embrionario in vitro, y 5) poner a punto las técnicas que permitan transferir los embriones obtenidos al útero de la mujer. Los primeros frutos de sus investigaciones los obtuvo Edwards

en 1965 cuando descubrió que los ovocitos humanos necesitan 24 horas de incubación *in vitro* antes de iniciar el proceso de maduración (4, 5) y en 1969 cuando utilizó con éxito las condiciones de cultivo para la capacitación de los espermatozoides que les permitiera la fecundación de ovocitos madurados *in vitro* (6). Sin embargo, los embriones obtenidos no progresaban más allá del estadio de dos células. Por ello decidió que los ovocitos a utilizar deberían completar su proceso de maduración *in vivo*, pero el nuevo problema radicaba en cómo extraer de los ovarios los ovocitos maduros. Este obstáculo fue resuelto cuando se asoció con el ginecólogo Dr. Patrick C. Steptoe quien, en 1968, había puesto a punto la técnica de laparoscopia que permite extraer de los ovarios de la mujer ovocitos madurados *in vivo* (7). No tengo la menor duda de que, si hubiera vivido (falleció en 1988), el Dr. Steptoe habría compartido el Premio Nobel con el Dr. Edwards.

El premio se le ha concedido al Dr. Edwards casi cuarenta años después de que publicara en 1970 y 1971 en colaboración con el Dr. Steptoe los primeros trabajos científicos que describían la obtención de embriones humanos por fecundación *in vitro* (FIV) que eran capaces de desarrollarse hasta la fase de 8-16 células e, incluso, blastocisto (8-10). Tras estos éxitos científicos solicitaron una subvención a largo plazo al Medical Research Council para continuar sus investigaciones que, sin embargo, les fue denegada en abril de 1971 "...debido a que se tienen serias dudas sobre los aspectos éticos de dicha investigación en seres humanos, muy en especial de los experimentos relacionados con la implantación de los óvulos fecundados *in vitro* en las mujeres... También se han expresado reservas sobre la legitimidad de usar la laparoscopia con objetivos puramente experimentales. En consecuencia, hemos tenido que dar por desestimada su solicitud" (transcrito en referencia 13, págs. 140-141). Para seguir adelante en sus investigaciones necesitaron fondos privados.

Tras más de cien intentos fallidos de transferencia de embriones al útero de la mujer, en 1976 transfirieron a una mujer un embrión FIV que no llegó a término porque se produjo un embarazo extrauterino (11); sin embargo, más tarde, el 25 de julio de 1978 nació en el Hospital de Oldham Louise Joy Brown —el primer "bebé probeta" del mundo— sin anomalía alguna (12). Es interesante resaltar que, años después, la propia Louise Brown ha sido madre sin tener que recurrir a

las técnicas de fecundación in vitro. Edwards y Steptoe escribieron en 1980 una narración autobiográfica de gran interés sobre los primeros años de sus investigaciones (13) cuya lectura es apasionante.

En los años siguientes Edwards y Steptoe, que habían creado su propia clínica en Cambridge (Bourn Hall Clinic), refinaron la técnica y la extendieron por todo el mundo: en 1983 habían nacido ya por FIV en su clínica 139 niños, llegando a 1.000 en 1986. Por esta época habían nacido otros mil niños FIV en otros países. Ante el impacto social que supuso el nacimiento de Louise Joy Brown, el Gobierno del Reino Unido puso en marcha la Comisión Warnok para que analizara la cuestión. Al Informe Warnok hecho público en 1984 siguió la aprobación en 1990 de la *Human Fertilisation and Embryology Act* en el Reino Unido y la creación en 1991 de la *Human Fertilisation and Embryology Authority* como organismo responsable en dicho país de los temas referentes a la reproducción humana.

La concesión ahora del Premio Nobel, a pesar de los años transcurridos, ha sido para honrar en vida al Dr. Edwards (tiene en la actualidad 85 años) y reconocer al mismo tiempo que la fecundación in vitro basada en sus pioneras investigaciones junto con el Dr. Steptoe han supuesto un paso importante en la Medicina Reproductiva. Las estadísticas mundiales indican que un 10% o más de las parejas son infértiles, que el 30-40% de los tratamientos FIV tiene éxito y que en muchos países con buen nivel médico los nacimientos mediante la técnica FIV suponen el 2-3% del total de nacimientos. Al día de hoy se estima que han nacido en el mundo unos 4.000.000 de niños por las técnicas de fecundación in vitro.

En España, el primer nacimiento por fecundación in vitro (la niña Victoria Anna) se produjo el 12 de julio de 1984 en el Instituto Dexeus de Barcelona (Dr. Pedro Barri, ginecólogo, y Dra. Anna Veiga, bióloga). Desde entonces y hasta 2009 se han producido más de 8.000 nacimientos por FIV en dicho Instituto. Según el estudio realizado por Barri y Veiga (14) al conmemorarse los 25 años del nacimiento de Victoria Anna, actualmente, la edad media de la mujer que se somete a una FIV es de 36,7 años, aunque más de la cuarta parte superan los 40 años. En 2008, el 8,4% de las mujeres atendidas en el Instituto Dexeus eran menores de 30 años, el 40,6% mayores de 35 años y el 26,6% mayores de 40 años. Como causas de la infertilidad se atri-

buyen en un 37,8% a la mujer, en el 36,7% al varón, en un 9% a ambos y en un 16,4% a causas desconocidas. Así como hace 25 años la tasa de embarazo tras FIV era de un 15-20%, hoy se ha duplicado al 35-40% (la tasa media europea se estima en un 30%), que son cifras superiores a las del rendimiento reproductivo natural de la especie humana. Obviamente, la edad de la mujer influye mucho en el resultado de la técnica: en menores de 35 años el éxito es de un 46% mientras que en mayores de 40 años se reduce a un 10%. Finalmente, la tasa de embarazos múltiples ha disminuido: en 2008, el 78,1% de los embarazos fue de feto único, el 20,1% fue embarazo gemelar y el 1,8% fueron trillizos.

En Europa, los últimos datos estadísticos de 20 países obtenidos por la Sociedad Europea para la Reproducción y Embriología Humana (ESHRE, 2010) (15) corresponden a 2006, habiéndose obtenido los siguientes resultados:

- En 998 clínicas de 32 países se utilizaron técnicas de reproducción asistida en 458.759 ciclos: FIV, 117.318 ciclos; ICSI, 232.844; transferencia de embriones descongelados (DCT), 86.059; donación de ovocitos (ovodonaciones), 12.685; maduración de ovocitos in vitro, 247; ovocitos congelados, 3.498; diagnóstico genético preimplantacional (DGP), 6.561.
- Inseminación artificial con semen de pareja (IAC), 134.261 ciclos (9,2% de partos en mujeres de menos de 40 años); Inseminación artificial con semen de donante (IAD), 24.339 ciclos.
- En 20 países, con un total de 422,5 millones de habitantes, se utilizaron técnicas de reproducción asistida en 359.110 ciclos (850 ciclos por millón de habitantes). Las tasas de gestación clínica para la FIV fueron 29,0% por aspiración y 32,4% por transferencia realizadas, mientras que para la ICSI fueron 29,9% y 33,0%, respectivamente. La proporción de partos simples, dobles y triples en las técnicas FIV e ICSI fue del 79,2%, 19,9% y 0,9%, respectivamente.
- En 2006, España era el tercer país europeo en FIV, solamente por detrás de Francia y Alemania: se hicieron más de 50.000 tratamientos FIV que dieron lugar a unas 26.000 transferencias embrionarias, resultando más de 5.600 partos.

En España, los últimos datos estadísticos de la fecundación in vitro (FIV, ICSI, DCT, ovodonación, DGP) corresponden al año 2008 y están recogidos en el último registro de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) del año 2010 (16). A pesar de que la normativa legal exige a los centros acreditados de Reproducción Humana Asistida que proporcionen los datos clínicos, la realidad es otra puesto que de 185 centros acreditados en el año 2002, el informe estadístico final realizado por la SEF solamente ha podido utilizar los datos de 90 centros (menos del 50%), 66 privados y 24 públicos. Se recogen a continuación algunos datos relativos al año 2008:

Se sometieron a estimulación hormonal de la ovulación un total de 22.053 pacientes y 3.015 donantes.

- Número de ciclos: FIV/ICSI, 26.246 (68,6%); DCT, 6.997 (18,3%); ovodonación, 4.068 (10,6%); DGP, 721 (1,9%); ovocitos congelados, 199 (0,5%); maduración de ovocitos in vitro, 14 (0,03%).
- 19.721 ciclos con transferencia de embriones: FIV, 2.197; ICSI, 15.447; FIV+ICSI, 2.077. La inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI) fue la técnica más utilizada (78,1%).
- Ciclos con transferencia de DCT (descongelación y transferencia): 5.764 transferencias embrionarias procedentes de 6.973 descongelaciones (82,7%).
- Transferencia de embriones procedentes de ovodonación: 3.880 (FIV, 295; ICSI, 3.241; FIV+ICSI, 344).
- Causas de esterilidad: Factor tubárico/femenino: 20,1%; factor masculino, 29,5%; causas mixtas, 24,4%; causas desconocidas, 12%.
- Número de embriones transferidos en ciclos FIV/ICSI: 41.105 embriones transferidos en 19.721 transferencias (2,1 embriones/transferencia). En el 14,2% de los casos sólo se transfirió un embrión, en el 63,2% de los casos se transfirieron 2 embriones y en el 22,6% se transfirieron 3 embriones.
- Número de embriones transferidos en ciclos de DCT: 11.559 embriones transferidos en 5.764 transferencias (2 embriones/transferencia). En el 21,5% de los casos se transfirió un solo embrión,

en el 56,5% de los casos se transfirieron 2 embriones y en el 22% se transfirieron 3 embriones.

- Número de embriones transferidos en ciclos de ovodonación: 8.328 embriones transferidos en 3.880 transferencias (2,1 embriones/transferencia). En el 5,4% de los casos sólo se transfirió un embrión, en el 74,6% de los casos se transfirieron 2 embriones en el 20% se transfirieron 3 embriones.
- Distribución de pacientes (ciclos) por grupos de edad:

Edad (años)	Óvulos propios (FIV, ICSI, FIV+ICSI) (N=24.447)	DCT (N=6.294)	Receptoras de ovocitos (N = 4.008)
≤ 29	8,0%	6,4%	2,4%
30-34	34,9%	31,9%	11,5%
35-39	43,7%	39,1%	28,8%
40-44	12,8%	17,7%	39,9%
≥ 45	0,7%	4,9%	17,3%

- Tasas de embarazo (%) en los ciclos FIV/ICSI:

	FIV	ICSI	FIV+ICSI	Total
Total embarazos	793	5.881	937	7.611
% embarazo/ciclo	27,2	30,6	37,7	30,9
% embarazo/punción	31,4	33,9	41,6	34,4
% embarazo/transferencia	36,1	38,1	45,1	38,6

- Tasas de embarazo (%) en ciclos DCT:

	FIV	ICSI	FIV+ICSI	Total
Total embarazos	190	1.203	196	1.589
% embarazo/descongelación	21,5	22,7	24,6	22,8
% embarazo/transferencia	26,8	27,5	29,1	27,6

- Tasas de embarazo (%) por ciclo en la ovodonación con embriones FIV/ICSI:

	FIV	ICSI	FIV+ICSI	Total
Total embarazos	165	1.676	206	2.047
% embarazo/ciclo	54,6	49,3	55,8	50,3
% embarazo/transferencia	55,9	51,7	59,9	52,8

- Tasas de embarazo (%) por ciclo por grupos de edad:

Edad (años)	Embarazos en fresco	Embarazos por DCT	Embarazos por ovodonación
≤ 29	813 (40,4%)	95 (23,5%)	47 (48,5%)
30-34	3.205 (36,8%)	515 (25,7%)	234 (50,9%)
35-39	3.018 (27,8%)	506 (20,6%)	576 (50,7%)
40-44	543 (18,0%)	230 (20,7%)	790 (49,4%)
≥ 45	5 (3,4%)	64 (20,8%)	371 (53,4%)

- Tasa de embarazo de maduración ovocitaria in vitro:

Total embarazos	8
% embarazos /aspiración	57,1%
% embarazos/transferencia	57,1%

- Tasa de embarazo con ovocitos congelados:

Total embarazos	48
% embarazos/descongelación	24,1%
% embarazos/transferencia	26,2%

- Evolución de las gestaciones:

	FIV	ICSI	FIV+ICSI	DCT	Ovodonación
Gestaciones clínicas	787	5.859	926	1.589	2.046
Abortos	126 (16,6%)	950 (17,9%)	174 (20,3%)	370 (24,8%)	378 (19,9%)
Ectópicos	13 (1,7%)	73 (1,4%)	15 (1,7%)	77 (5,2%)	62 (2,7%)
Evolución desconocida	26 (3,4%)	542 (10,2%)	68 (7,9%)	96 (6,4%)	147 (7,7%)

- Multiplicidad de las gestaciones:

	FIV	ICSI	FIV+ICSI	DCT	Ovodonación
Gestaciones	774	5.786	911	1.512	1.994
Gestación simple	602 (77,8%)	4.417 (76,3%)	653 (71,7%)	1.262 (83,5%)	1.411 (70,8%)
Gestación doble	158 (20,4%)	1.274 (22,0%)	238 (26,1%)	244 (16,1%)	552 (27,7%)
Gestación triple	14 (1,8%)	95 (1,6%)	20 (2,2%)	6 (0,4%)	31 (1,6%)

- Multiplicidad de los partos:

	Ciclos en fresco	Ciclos DCT	Ciclos ovodonación	Totales
Partos totales	4.522	854	1.277	6.653
Simple	3.405 (75,3%)	691 (80,9%)	874 (68,4%)	4.970 (74,7%)
Doble	1.075 (23,8%)	159 (18,6%)	388 (30,4%)	1.622 (24,4%)
Triple	42 (0,9%)	4 (0,5%)	15 (1,2%)	61 (0,9%)

- Ovocitos totales: Usados en reproducción en fresco, 155.072; crioconservados, 515.

- Parámetros de excelencia en ciclos en fresco: Como parámetro de excelencia en ciclos en fresco se ha considerado el cociente del número de partos entre el número de embriones transferidos (independientemente del número de niños nacidos en un parto):
  - Total de embriones transferidos en ciclos en fresco: 41.105, en 19.721 transferencias (2,1 embriones/transferencia).
  - 2.793 transferencias de un solo embrión (14,0%); 12.474 transferencias de 2 embriones (63,0%), 4.456 transferencias de 3 embriones (23,0%).
  - 7.611 gestaciones (39 gestaciones por cada 100 transferencias); 5.672 gestaciones únicas (29 gestaciones únicas por cada 100 transferencias).
  - 4.522 partos (23 partos por cada 100 transferencias; 59 partos por cada 100 gestación); 3.405 partos únicos (7 partos únicos por cada 100 transferencias); 1.075 partos dobles (55 partos dobles por cada 1.000 transferencias); 42 partos triples (21 partos triples por cada 10.000 transferencias).

Ante la nueva realidad social española se han promulgado sucesivas normativas legales: Ley 35/1988, sobre Técnicas de Reproducción Asistida; Real Decreto 415/1997 por el que se crea la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida; Ley 45/2003, por la que se modifica la Ley 35/1988; Ley 14/2006, sobre técnicas de reproducción humana asistida y la Ley 14/2007 de investigación biomédica que he tenido ocasión de comentar desde le punto de vista bioético en trabajos previos (17, 18).

Dentro del contexto de la conmemoración de los Premios Nobel hay que señalar que las investigaciones de los Dres. Edwards y Steptoe han sido la herramienta de trabajo utilizada por muchos científicos en campos como el del manejo de las células troncales pluripotentes embrionarias humanas (19).

La concesión del Premio Nobel a la fecundación in vitro humana, personalizada en su descubridor el Dr. Edwards, ha reavivado en algunos ámbitos el debate bioético sobre la utilización de dicha técnica que ha sido abordado por el autor en otro lugar (20).

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Pincus, G. & Enzmann, E. V. (1935) The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. The activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med.* 62: 665-675.
2. Chang, M. C. (1959) Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature.* 184: 466-467.
3. Yanagimachi, R. & Chang, M. C. (1963) Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature.* 200: 281-282.
4. Edwards, R. G. (1965) Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature.* 208: 349-351.
5. Edwards, R. G. (1965) Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *The Lancet.* 2: 926-929.
6. Edwards, R. G., Bavister, B. D. & Steptoe, P. C. (1969) Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature.* 221: 632-635.
7. Steptoe, P. C. (1968) Laparoscopy and ovulation. *Lancet.* 2: 913.
8. Steptoe, P. C. & Edwards, R. G. (1970) Laparoscopic recovery of preovulatory human oocytes after priming of ovaries with gonadotrophins. *Lancet.* 1: 683-689.
9. Edwards, R. G., Steptoe, P. C. & Purdy, J. M. (1970) Fertilization and cleavage in vitro of preovulatory human oocytes. *Nature.* 227: 1307-1309.
10. Steptoe, P. C., Edwards, R. G. & Purdy, J. M. (1971) Human blastocysts grown in culture. *Nature.* 229: 132-133.
11. Steptoe, P. C. & Edwards, R. G. (1976) Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet.* 1: 880-882.
12. Steptoe, P. C. & Edwards, R. G. (1978) Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet.* 2: 366.
13. Edwards, R. G. & Steptoe, P. C. (1980) A matter of life, *Hutchinson & Co. (Publishers) Ltd., London (traducido al español por J. Adsuar, "Cuestión de vida", Editorial Argos Vergara, S.A., Barcelona, 1980).*
14. Barri, P. N. & Veiga, A. (2009) Victoria Anna, la primera niña concebida por fecundación in vitro en España, cumple 25 años. *Salud de la Mujer Dexeus, Departamento de Obstetricia, Ginecología y Reproducción, USP Institut Universitari Dexeus, Barcelona.*
15. ESHRE (J. de Mouzon *et al.*). (2010) Assisted reproductive technology in Europe, 2006: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction.* doi:10.1093/humrep/deq124, pp. 1-12.
16. Registro SEF. (2010) Registro FIV-ICSI de la Sociedad Española de Fertilidad. Año 2008.
17. Lacadena, J. R. (2006) La Ley 14/2006 sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida: consideraciones científicas y éticas. *Rev. Der. Gen. H.* 24: 157-184.
18. Lacadena, J. R. (2007) La Ley 14/2007 de Investigación Biomédica: algunos comentarios sobre aspectos éticos y científicos. *Rev. Der. Gen. H.* 27: 13-35.
19. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. & Jones, J. M. (1998) Embryonic stem cells derived from human blastocysts. *Science.* 282: 1145-1147.
20. Lacadena, J. R. (2010) Nobel de Medicina, ¿una puerta que nunca debió abrirse? *Vida Nueva.* 2.725: 35.



## **Transferencia selectiva de un único embrión como prevención del embarazo múltiple**

**Pedro N. Barri\*, Buenaventura Coroleu, Elisabet Clua, Rosa Tur**

Servicio de Medicina de la Reproducción. Departamento de Obstetricia, Ginecología y Reproducción. Institut Universitari Dexeus, Barcelona.

### **RESUMEN**

El desarrollo de las Técnicas de Reproducción Asistida ha representado un importante avance en el tratamiento de la infertilidad humana. Sin embargo, la alta eficacia de las mismas ha traído consigo un incremento excesivo de las tasas de embarazo múltiple con las graves consecuencias médicas, económicas y sociales que ello comporta. Actualmente tanto las sociedades científicas como los profesionales de la salud como las propias parejas estériles son conscientes de estos riesgos y de forma coordinada se han establecido diversas estrategias para hacer frente a esta situación.

El resultado que se está obteniendo de la estrategia de reducir selectivamente el número de embriones transferidos es evidente. La pandemia de embarazos múltiple se está controlando y con ello estamos haciendo una prevención eficaz de las complicaciones obstétricas y neonatales derivadas de los mismos. Esperamos que ello contribuirá también a reducir significativamente las tasas de prematuridad y por tanto de complicaciones neonatales severas.

**Palabras Clave:** Esterilidad; embarazo múltiple; prematuridad; transferencia selectiva de un embrión.

## ABSTRACT

### Prevention of prematurity by single embryo transfer.

The development of Assisted Reproduction Techniques represents an important advance in the treatment of human infertility. However, their great effectiveness has brought with it an excessive increase in multiple pregnancy rates with the serious medical, financial and social consequences that they entail. Now, the scientific societies, the health professionals, and the infertile couples themselves are aware of these risks and have worked together to implement various strategies to deal with this situation.

The result that is being obtained from the strategy of selectively reducing the number of embryos transferred is obvious. The pandemic of multiple pregnancies is being brought under control and so we have effective prevention of the obstetric and neonatal complications arising from it. It is to be hoped that it will also contribute to significantly reducing the rates of prematurity and thus of severe neonatal complications.

**Keywords:** Infertility; multiple pregnancy; prematurity; single embryo transfer.

## 1. INTRODUCCIÓN

Es bien conocido el riesgo obstétrico y perinatal que se asocia a los embarazos múltiples. En España las tasas de prematuridad se sitúan alrededor del 8% y a pesar de la mejoría de las condiciones socio sanitarias y de los avances científicos, no han variado en los últimos diez años. Complicaciones graves como la prematuridad extrema y las secuelas neurológicas graves tales como la parálisis cerebral aumentan de forma exponencial en función del rango de multiplicidad de una gestación.

Según los registros demográficos españoles de los últimos veinte años la tasa de parto gemelar se ha doblado (75 de cada 10,000 partos en 1980; 175 en 2004) y la tasa de trillizos ha aumentado seis veces (11 de cada 10,000 en 1980; 60 en 2004) (15) el origen de esta pan-

demia debería ser buscado, en primer lugar en el aumento de la edad de las pacientes, pero es sobre todo debido al desarrollo de Técnicas de Reproducción Asistida (TRA), especialmente en FIV, en las cuales habitualmente se transfiere más de un embrión. A pesar de las directrices propuestas por diferentes sociedades científicas para limitar el número de embriones a transferir, la tasa de embarazo múltiple sigue aumentando. La responsabilidad de prevenir el embarazo múltiple reside en los profesionales de salud que deben ser conscientes de los riesgos que comportan los embarazos gemelares y triples. Deben ser los profesionales los que propongan una política de transferencia selectiva del número de embriones a transferir (1).

En la década pasada y gracias al trabajo pionero de los grupos escandinavos, la transferencia selectiva de un único embrión (SET) ha sido extensamente aplicada sobre todo en pacientes jóvenes con buen pronóstico sin por ello comprometer la tasa de embarazo (19).

Una reciente revisión del SET (3) ha puesto de manifiesto, tras evaluar los resultados publicados de un estudio prospectivo y randomizado que las tasas de embarazo son superiores en la transferencia selectiva de dos embriones (DET) comparado con el grupo de transferencia selectiva de un embrión, pero éste tiene una tasa de embarazo gemelar del 30%.

Hace unos años, en nuestro centro en los casos de mujeres de menos de 38 años y con dos embriones de buena calidad, se instauró una política de transferencia embrionaria selectiva con el fin de obtener una reducción del embarazo múltiple. Teniendo en cuenta la edad de la paciente y el número de embriones de buena calidad, creamos un score de embarazo múltiple el cual nos permite proponer a las parejas la transferencia selectiva de un único embrión (SET) o bien la transferencia selectiva de dos embriones (DET) (Tabla 1).

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

Hemos realizado un estudio prospectivo en el cual se ha propuesto la transferencia selectiva de un embrión (SET) a 680 parejas de nuestro programa de FIV que cumplieran ambos criterios, edad inferior a 38 años y al menos 2 embriones de buena calidad, se efectuó la

transferencia selectiva de un único embrión (SET) a 355 parejas que aceptaron nuestra sugerencia (52.2%) mientras que 325 (47.8%) solicitaron la transferencia de dos embriones (DET).

Los dos grupos eran similares pero las pacientes que solicitaron DET habían sido sometidas a más ciclos que los que escogieron el SET ( $p < 0.0001$ ).

También hemos realizado un análisis retrospectivo de 874 ciclos de donación de ovocitos en fresco y hemos comparado los resultados obtenidos en 58 pacientes en las cuales se realizó SET frente a 816 pacientes que recibieron un DET. Después de las transferencias embrionarias en fresco, un total de 666 transferencias de embrión congelado (FET) fueron realizadas; 69 en el grupo de SET y 597 en el grupo DET. La edad media de las donantes de ovocitos era similar en el SET y en el grupo DET ( $26.8 \pm 4.9$  contra  $26.7 \pm 4.4$ ). Sin embargo, la edad media de las receptoras era inferior en el grupo de SET ( $38.0 \pm 5.8$ ) que en el grupo DET ( $41.0 \pm 5.3$ ) ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 1. Política de transferencia embrionaria. Institut Universitari Dexeus**

Edad	Nº de embriones de alta calidad	Nº de embriones a transferir
< 30	$\geq 1$	1
	0	2
30-32	$\geq 2$	1
	0-1	2
33-34	$\geq 3$	1
	0-2	2
35-37	$\geq 0$	2
	$\geq 2$	2
38-39	$\geq 2$	2
	0	3

### 3. RESULTADOS

Las tasas de embarazo fueron considerablemente más altas en el DET (58.2%) comparándose con el grupo de SET (45.4%) ( $p < 0.05$ ), pero la tasa de embarazo gemelar fue del 27% con DET. Cuando ana-

lizamos esta información por grupos de edad, observamos que no hay diferencias significativas en pacientes hasta 33 años (SET, el 54.9% versus DET, el 64.8%) aunque sí fueron encontradas en mujeres de más edad (el SET, el 38.5% contra DET, el 56.9%) ( $p < 0.05$ ) (Tabla 2).

**Tabla 2. Resultados de la transferencia selectiva de uno (SET) o dos (DET) embriones**

	SET	DET	P
Transfers (n)	355	325	
Ovocitos inseminados (n)	15.2 ± 6.4	13.2 6.5	<0.001
Ovocitos fertilizados (n)	11.6 ± 5.3	9.9 5.1	<0.001
Embriones divididos (n)	8.0 ± 3.4	6.7 3.6	<0.001
Tasa de embarazo/transferencia (n, %)	161 (45.4%)	189 (58.2%)	<0.001
Tasa de implantación (%)	45.9%	37.7%	<0.05
Embarazo gemelar (n, %)	2 (1.2%)	51 (27%)	<0.001
Embarazo triple (n, %)	0 (0%)	2 (1.1%)	<0.001
Aborto (n, %)	17 (10.6%)	30 (15.9%)	ns

Un aspecto importante a considerar es el estudio de la tasa de embarazo acumulada tras la transferencia de embriones frescos en el ciclo inicial añadiendo la criotransferencia de los embriones congelados que quedaban del ciclo inicial. Analizando las tasas de embarazo acumuladas vemos que las diferencias desaparecen alcanzándose excelentes resultados sin que estén afectados por la edad de las pacientes (Tabla 3).

Hemos estudiado los resultados perinatales obtenidos en los embarazos de estas pacientes y hemos podido comprobar que en los embarazos conseguidos tras aplicar SET se reducen significativamente las tasas de prematuridad < 37 semanas y de peso al nacer < 2.500 grs en comparación a las tasas obtenidas tras DET (Tabla 4).

Los resultados obtenidos con la donación de ovocitos mostraron que la tasa de embarazo era inferior con el SET (28/58, el 43.1%) que con DET (463/816, el 56.7%) ( $p < 0.05$ ). La tasa de embarazo múltiple con DET era del 38.4% (178/463) mientras que no aumentaron los

**Tabla 3. Resultados acumulados de la transferencia selectiva de uno (SET) o dos embriones (DET)**

	SET	DET	P
Transferencia	328	300	—
Edad	30.8 ± 2.4	30.9 ± 2.5	—
Ciclos de FIV previos	1.2 ± 0.5	1.6 ± 0.9	<0.001
Embriones disponibles	8.0 ± 3.5	6.8 ± 3.1	<0.001
Embriones congelados	7.0 ± 3.5	5.0 ± 3.5	<0.001
Embarazo/Transferencia	153 46.6%	178 59.3%	0.001
Tasa de implantación	45.9%	37.8%	<0.001
Tasa acumulada de embarazo/Transferencia (Fresco + Congelado)	217/328 66.2%	209/300 69.7%	—
Tasa acumulada de niño vivo/Transferencia	173/328 52.7%	165/300 55%	—

embarazo múltiples como consecuencia del SET ( $p < 0.05$ ). Además, las tasas de niño vivo eran comparables en los dos grupos (SET; 20/58, 34.5% y DET; 359/816, 44.0%). En ciclos de criotransferencia y después de transferir un número similar de embriones ( $1.9 \pm 0.5$  en el SET anterior y  $2.0 \pm 0.7$  en DET anterior) el embarazo acumulativo y tasas de niño vivo eran del 84% y del 75.9% con el SET y del 77% y del 63.4% en el grupo DET (n.s.) (Tabla 5).

**Tabla 4. Evolución del embarazo. Prematuridad y peso al nacer**

		SET	DET	P
Semanas de gestación	< 28 semanas	—	5 (3.4%)	NS
	< 34 semanas	2 (1.5%)	8 (5.4%)	NS
	< 37 semanas	14 (10.5%)	33 (22.1%)	0.003
Peso al nacer	< 1500 grs	—	12 (6.3%)	—
	1500-2499 grs	13 (9.7%)	55 (28.9)	< 0.05
	> 2500 grs	121 (90.3%)	123 (64.7%)	< 0.05

#### 4. DISCUSIÓN

Aunque para algunos autores el embarazo múltiple, especialmente el gemelar, no debe ser considerado como una complicación y es bien aceptado por las parejas estériles (7), existe un alto nivel de consenso que advierte del exponencial aumento de complicaciones maternas y fetales que se producen en las gestaciones múltiples (18). Por este motivo las estrategias que proponen reducir selectivamente el número de embriones a transferir constituyen una práctica clínica cada día más frecuente en los programas de IVF para reducir las tasas de embarazo múltiple y por tanto de complicaciones graves como la prematuridad.

Numerosos estudios demuestran que al aplicar SET en los ciclos en fresco de FIV se reducen un 30% las tasas de embarazo y un 90% las tasas de embarazo múltiple (6). En la misma línea van los resultados de una revisión de Cochrane que tras una revisión sistemática de 4 estudios seleccionados, demuestra que el SET reduce significa-

**Tabla 5. Resultados acumulados de la transferencia selectiva de uno (SET) o dos (DET) embriones tras donación de ovocitos**

	SET	DET	P
	(n = 58)	(n = 816)	
Edad de las receptoras, años	38.9 ± 5.8	41.1 ± 5.3	< 0.05
Edad de las donantes, años	26.8 ± 4.9	26.7 ± 4.4	NS
Ovocitos inseminados, n	10.4 ± 2.7	10.4 ± 3.2	NS
Ovocitos fertilizados, n	8.4 ± 2.3	8.2 ± 2.8	NS
Embriones de alta calidad, n	4.3 ± 2.4	3.4 ± 2.5	< 0.05
Tasa de embarazo/Transferencia n (%)	25 (43.1)	463 (56.7)	< 0.05
Embarazo gemelar, n (%)	0 (0)	178 (38.4)	< 0.05
Niños vivos, n (%)	20 (34.5)	359 (44.0)	NS
Criotransferencias (n)	69	597	< 0.05
Embriones transferidos	1.92 ± 0.5	2.01 ± 0.7	NS
Tasa de embarazo/Criotransferencia n (%)	30 (43.5)	176 (29.5)	< 0.05
Embarazo gemelar, n (%)	5 (16.7)	37 (22.0)	NS

tivamente el riesgo de embarazo múltiple pero también reduce la posibilidad de niño vivo en un ciclo fresco de FIV (10). Asimismo, hay algún estudio reciente que prueba que incluso en el ciclo en fresco no hay diferencias en las tasas de embarazo obtenidas tras SET o tras DET (2). Sin embargo, existe ya una gran evidencia que demuestra que al combinar los resultados de las transferencias en fresco con las posteriores transferencias de embriones congelados, la reducción en la tasa de embarazo que se producía en los ciclos en fresco de SET, desaparece al analizar las tasas de embarazo acumuladas tras combinar las transferencias en fresco y las criotransferencia (14) o incluso puede mejorar (16).

Otra alternativa que puede proponerse a pacientes de buen pronóstico es transferir un único blastocisto. Seguir esta estrategia puede reducir significativamente la tasa de embarazo múltiple sin reducir la tasa de embarazo especialmente en pacientes jóvenes por debajo de los 40 años (8-12). Un interesante estudio ha demostrado recientemente que la tasa de embarazo gemelar monocigótico no aumenta tras la transferencia de un único blastocisto comparado con la transferencia de un único embrión en estadio de división precoz (11).

Es importante considerar que existen modelos predictivos que tras un análisis de regresión logística pueden identificar factores negativamente asociados a la posibilidad de obtener un embarazo clínico tras SET, como un alto índice de masa corporal y/o un elevado requerimiento de gonadotropinas y/o un alto número de ovocitos recuperados en la punción folicular mientras el factor más positivamente relevante es el número de embriones de alta calidad disponibles para la transferencia (17).

Los estudios que evalúan los resultados obstétricos y perinatales obtenidos al aplicar SET frente a los conseguidos con DET muestran claramente que al reducir la tasa de embarazo múltiple mejoran significativamente todos los parámetros obstétricos y perinatales (5).

Afortunadamente las distintas sociedades científicas internacionales son conocedoras de la situación social que se ha creado y de la información médica favorable a la reducción selectiva del número de embriones a transferir. Por este motivo, la mayoría de ellas han publicado sus respectivas recomendaciones sobre el número de embriones a transferir en función de las características de cada paciente (4,

9,13,15). Las sociedades científicas y los profesionales de la salud deben concienciarse del problema, facilitar el medio necesario para rectificar e informar a las parejas estériles de estos riesgos antes del comienzo de un ciclo de FIV.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Barri, P. N. (2005) Multiple pregnancies: a plea for informed caution. *Human Reproduction Update*. 11: 1-2.
2. Bechoua, S., Astruc, K., Thouvenot, S., Girod, S., Chiron, A., Jimenez, C. & Sagot, P. (2009) How to demonstrate that eSET does not compromise the likelihood of having a baby? *Human Reproduction*. 24-12: 3073-3081.
3. Bergh, C. H. (2005) Single embryo transfer: a mini review. *Human Reproduction*. 20: 323-327.
4. Cutting, R., Morroll, D., Roberts, S. A., Pickering, S., Rutherford, A. & The BFS and ACE (2008) Elective single embryo transfer: Guidelines for Practice British Fertility Society and Association of Clinical Embryologists. *Human Fertility*. 1-3: 131-146.
5. Fauque, P., Jouannet, P., Davy, C., Guibert, J., Viallon, V., Epelboin, S., Kuntsman, J. M. & Patrat, C. (2009) Cumulative results including obstetrical and neonatal outcome of fresh and frozen-thawed cycles in elective single versus double fresh embryo transfers. *Fertility and Sterility*. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.03.105.
6. Gelbaya, T. A., Tsompou, I. & Nardo, L. G. (2009) The likelihood of live birth and multiple birth after single versus double embryo transfer at the cleavage stage: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.04.003.
7. Gleicher, N. & Barad, D. (2009) Twin pregnancy, contrary to consensus is a desirable outcome in infertility. *Fertility and Sterility*. 91-6: 2426-2431.
8. Mullin, C. M., Fino, M. E., Talebian, S., Key, L. C., Licciardi, F. & Grifo, J. A. (2010) Comparison of pregnancy outcomes in elective single blastocyst transfer versus double blastocyst transfer stratified by age. *Fertility and Sterility*. 93-6: 1837-1843.
9. Ombelet, W., De Sutter, P., Van Der Elst, J. & Martens, G. (2005) Multiple gestation and infertility treatment: registration, reflection and reaction. The Belgian project. *Human Reproduction Update*. 11: 3-14.
10. Pandian, Z., Templeton, A., Serour, G. & Bhattacharya, S. (2005) Number of embryos for transfer after IVF and ICSI: a Cochrane review. *Human Reproduction*. 20-10: 2681-2687.
11. Papanikolaou, E. G., Fatemi, H., Venetis, C., Donoso, P., Kolibianakis, E., Tourayne, H., Tarlatzis, B. & Devroey, P. (2010) Monozygotic twinning is not increased after single blastocyst transfer compared with single cleavage-stage embryo transfer. *Fertility and Sterility*. 93-2: 592-7.

12. Stillman, R. J., Richter, K. S., Banks, N. K. & Graham, J. R. (2008) Elective single embryo transfer: A 6- year progressive implementation of 784 single blastocyst transfers and the influence of payment method on patient choice. *Fertility and Sterility*. 92-6: 1895-906.
13. The Practice Committee of the ASRM and the Practice Committee of the SART (2009) Guidelines on number of embryos transferred. *Fertility and Sterility*. 92-5: 1518-1519.
14. Thurin, A., Hausken, J., Hillensjo, T., Jablonowska, B., Pinborg, A., Strandell, A. & Bergh, C. (2004) Elective single-embryo transfer versus double embryo transfer in in vitro fertilization. *The New England Journal of Medicine*. 351: 2392-402.
15. Tur, R., Coroleu, B., Torelló, M. J.; Boada, M., Veiga, A. & Barri, P. N. (2006) Prevention of multiple pregnancy following IVF in Spain. *Reproductive Biomedicine Online*. 13-6: 856-63.
16. Veleva, Z., Karinen, P., Tomás, C., Tapanainen, J. S. & Martikainen, H. (2009) Elective single embryo transfer with cryopreservation improves the outcome and diminishes the costs of IVF/ICSI. *Human Reproduction*. 24-7: 1632-1639.
17. Verberg, M., Eijkemans, M. J. C., Macklon, N. S., Heijnen, E. M., Fauser, B. C. & Broekmans, F. J. (2007) Predictors of ongoing pregnancy after single-embryo transfer following mild ovarian stimulation for IVF. *Fertility and Sterility*. 89-5: 1159-1165.
18. Ville, Y. (2009) Grossesses gemellaires. Toute réponse est aussi une question. *Journal de Gynecologie Obstetrique et Biologie de la Reproduction*. 38: S3-S4.
19. Vilska, S., Tiitinen, A. & Hyden-Granskog, C. (1999) Elective transfer of one embryo results in an acceptable pregnancy rate and eliminates the risk of multiple birth. *Human Reproduction*. 14: 2392-2395.

**\* Información de contacto:**

Dr. Pedro N. Barri.

Director del Departamento de Obstetricia, Ginecología y Reproducción.

Institut Universitari Dexeus.

Gran Vía Carlos III, 71-75.

08028, Barcelona.

Tel.: +34 93 227 47 00 / +34 93 227 47 10.

Fax: +34 93 205 79 66.

e-mail: pbarri@dexeus.com

## El Premio Nobel en Química 2010

María del Carmen Avendaño López\*

Catedrática de Química Orgánica y Académica de Número de la RANF.

### 1. INTRODUCCIÓN

Una de las sesiones más relevantes de la RANF es la que organiza el Profesor Lacadena dedicada a comentar el premios Nobel de Medicina y Fisiología, por una parte, y el de Química, por otra. Al igual que en 2001 y 2005, cumpla el encargo de la Junta de Gobierno de comentar el Premio Nobel de Química del presente año. Desde 1901 la Real Academia de Ciencias de Suecia ha concedido dicho premio a 160 científicos. Centrándonos en los temas premiados en el presente siglo (Tabla 1), podemos observar que la Química Aplicada a la Biología va adquiriendo mayor peso (6 premios en los años 2002, 2003, 2004, 2006, 2008 y 2009) que la Química Física (1 premio en 2007) y que la Síntesis Orgánica (3 premios en 2001, 2005 y 2010).

### 2. NATURALEZA VERSUS LABORATORIO

Los nuevos materiales obtenidos por métodos físicos pueden no ser idénticos a los que se encuentran en la naturaleza, pero la Síntesis Orgánica es capaz de producir estructuras idénticas a las naturales. Konstantin Novoselov, galardonado junto con Andre Geim con el Premio Nobel de Física de este año por el descubrimiento del grafeno ha dicho: *“Se está trabajando mucho para hacer grandes láminas **de grafeno sintético** porque impulsará sus aplicaciones. Pero el sintético **no es tan bueno como el natural**, aunque suficiente para muchos usos... La verdad es que la naturaleza lo hace mejor que nosotros”*. Los químicos orgánicos que trabajan en la síntesis de estructuras comple-

jas utilizando estrategias clásicas o novedosas podrían decir: “*Se ha trabajado y se está trabajando mucho para sintetizar estas estructuras a fin de impulsar sus aplicaciones. Los compuestos sintéticos son tan buenos como los naturales, aunque la verdad es que la naturaleza lo hace mejor que nosotros*”.

**Tabla 1. Premios Nobel de Química del siglo XXI**

<b>Año</b>	<b>Científicos premiados</b>	<b>Tema</b>
2001	K. B. Sharpless, W. S. Knowles, y R. Noyori	“Catalizadores quirales en reacciones de oxidación y reducción”
2002	J. B. Fenn, K. Tanaka y K. Wüthrich	“La desorción iónica y la RMN en el análisis espectrométrico de macromoléculas biológicas”
2003	P. Agre y R. MacKinnon	“Canales de agua y mecanismos de intercambio iónico en las membranas celulares”
2004	A. Ciechanover, A. Hershko e I. Rose	“Descubrimiento de la degradación proteínica causada por la ubiquitina”
2005	Y. Chauvin, R. H. Grubbs y R. R. Schrock	“Desarrollo del método de metátesis olefínica en la química orgánica”
2006	R. D. Kornberg	“Bases moleculares de la transcripción genética”
2007	G. Ertl	“Procesos químicos sobre superficies sólidas”
2008	O. Shimomura, M. Chalfie y R. Y. Tsien	“Descubrimiento y desarrollo de la proteína verde fluorescente (GFP)”
2009	V. Ramakrishnan, T. A. Steitz y A. Yonath	“Estructura y función de los ribosomas”
2010	R. Heck, E-i. Negishi; A. Suzuki	“Reacciones químicas catalizadas por paladio”

### **3. PREMIO NOBEL DE QUÍMICA 2010. REACCIONES DE ACOPLAMIENTO CRUZADO CATALIZADAS POR PALADIO**

Los tres galardonados son: Richard F. Heck (1931), Profesor Emérito de la Universidad de Delaware, Ei-ichi Negishi (1935) que ha trabajado 50 años en EE.UU. y actualmente en la Universidad de Pur-

due, y Akira Suzuki (1930) que es Profesor Emérito de la Universidad de Hokkaido. El premio les ha sido otorgado *“En base a su contribución al desarrollo de métodos sintéticos catalizados por complejos de paladio, que han permitido la preparación de miles de compuestos orgánicos de estructuras variadas, útiles en todas las áreas en las que influye la Química: salud, alimentación, agricultura, tecnología, materiales, energía, etc.”*

Sorprende este año la edad de los galardonados, que rondan los 80 años, pero no que su trabajo se haya realizado en Japón y Estados Unidos. Tampoco sorprende que se premie el uso de un metal de transición como catalizador, ya que estos metales también protagonizaron los premios Nobel del 2001 (reacciones asimétricas) y del 2005 (reacciones de metátesis).

Las reacciones de acoplamiento C-C catalizadas por Pd se encuentran entre las más prominentes en Síntesis Orgánica (1). Con catalizadores de Pd pueden producirse los compuestos trabajando a menores temperaturas y con menos disolventes, originando menos residuos, y con menor coste. El Dr. Lars Thelander, Presidente del Comité del Premio Nobel de Química ha dicho: *“Palladium has this magic property that it can bind different carbons, make them come very close together and then react under very mild conditions”*. Estas reacciones fueron concebidas originalmente por Heck (2, 3) y Mizoroki (4), seguidos por Stille (5), Negishi (6), Sonogashira (7) y Suzuki (8), entre otros. Según el Dr. Thelander, hace tiempo que se quería dar un Nobel a la química del Pd, pero había un problema: cómo determinar cuales eran los que más lo merecían. Esta química se sigue investigando, especialmente para que las reacciones sean más compatibles con el medio ambiente y para ampliar sus aplicaciones (9). En la última publicación citada, Negishi sanciona: *“We may propose here that the ultimate goal of organic synthesis would be to be able to synthesize any desired and fundamentally synthesizable organic compound (a) in high yields, (b) efficiently (in as few steps as possible, for example), (c) selectively preferably all in 98–99% selectivity, (d) economically, and (e) safely, abbreviated hereafter as the **y(es)**<sup>2</sup> manner”*.

Muchos fármacos, plásticos, y otros compuestos industriales están formados por átomos de carbono, pero conseguir unir un átomo de carbono a otro no es tarea fácil. Hace casi 100 años, Grignard comen-

zó a facilitarla al acoplar un átomo de magnesio a un carbono, haciendo a éste más rico en electrones. Los Premios Nobel de Química de este año, junto con otros investigadores que no han conseguido este galardón (Mizoroki y Stille por su prematuro fallecimiento), debieron preguntarse: *¿Por qué no inventar modos más directos para formar enlaces C-C?*

#### 4. APORTACIONES PREMIADAS

En 1968 el Dr. Heck, que trabajaba en la empresa “Hercules Inc.” en Wilmington (Delaware), publicó reacciones químicas nuevas utilizando sales de Pd como ingrediente clave para juntar átomos de carbono, demostrando que las sales de arilpaladio preparadas por transmetalación de compuestos organomercurícos, eran reactivos de utilidad en reacciones de sustitución de grupos vinilo (2). Después se comprobó que los intermedios de organopaladio podían generarse por paladación electrófila directa (10). En ambos casos, la sal de Pd(II) se reducía a Pd(0) (Figura 1), y estas sales eran caras.

El químico japonés Tsutomu Mizoroki consiguió una mejora importante al descubrir que los haluros orgánicos eran precursores adecuados de especies de organopaladio, y que la sustitución vinílica podía realizarse con cantidades catalíticas de Pd y una base, en ausencia de reoxidantes. Se trataba de una nueva reacción catalizada por Pd(0), que hoy conocemos como **reacción de Mizoroki-Heck** (Figura 2, ecuación 1). En ella, una olefina es el nucleófilo y los electrófilos son generalmente haluros o triflatos de arilo o de vinilo (los fosfatos se usan con menos frecuencia). El Dr. Heck, trasladado a la Universidad de Delaware, mejoró el trabajo de Mizoroki, aumentando el valor práctico de las reacciones (11).

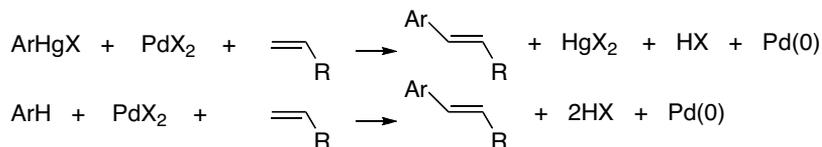
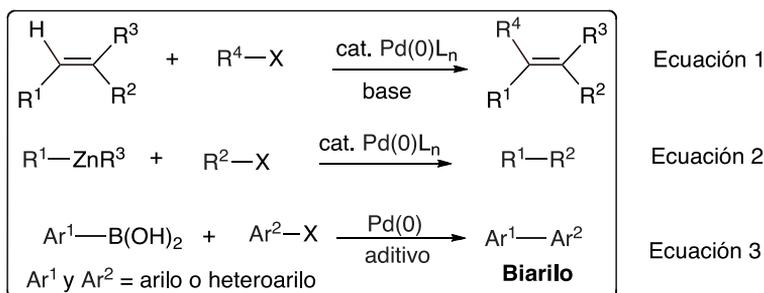


Figura 1. Primeras reacciones de Heck.

En 1977, el Dr. Negishi utilizó compuestos de Zn para facilitar la mezcla de átomos de carbono sobre el Pd y, dos años más tarde, el Dr. Suzuki encontró que los compuestos de boro funcionaban mejor. Según se ha dicho, en la **reacción de Negishi** el nucleófilo es un compuesto organozíncico (Figura 2, ecuación 2), aunque este autor ha desarrollado también diversas reacciones en las que los nucleófilos son compuestos de organozirconio u organoaluminio. Los acoplamientos C-C originados en la **reacción de Suzuki** (1979), conocida también como reacción de Suzuki-Miyaura (Figura 2, ecuación 3), emplean compuestos organoboranos como nucleófilos y se han utilizado principalmente en la síntesis de biarilos. Hay que señalar que en los acoplamientos catalizados por Pd se pueden utilizar, además de organozíncicos y organoboranos, otros organometálicos que contengan Al, Zr, Sn, Li, Mg, In, Si, Cu, y Mn.

En la Figura 3 se han representado algunos de los varios acoplamientos catalizados por Pd que se han desarrollado como alternativas a las reacciones anteriormente mencionadas. Su principal diferencia reside en la naturaleza del nucleófilo utilizado. La reacción de Stille (1977) utiliza como nucleófilos organoestannanos (Figura 3, ecuación 1), mientras que la de Sonogashira (1975) utiliza alquinos terminales. Esta última es una reacción de Heck mejorada por la presencia de sales de Cu(I), y compite con la reacción de Negishi (Figura 3, ecuación 2). Menos populares son la reacción de Tsuji-Trost (1981) que permite sustituciones nucleófilas con retención de la configuración (Figura 3, ecuación 3), y la de Buchwald-Hartwig (1995), que permite sustituciones nucleófilas con haluros de arilo (Figura 3, ecuación 4).



**Figura 2. Reacciones originales de Heck, Negishi y Suzuki.**

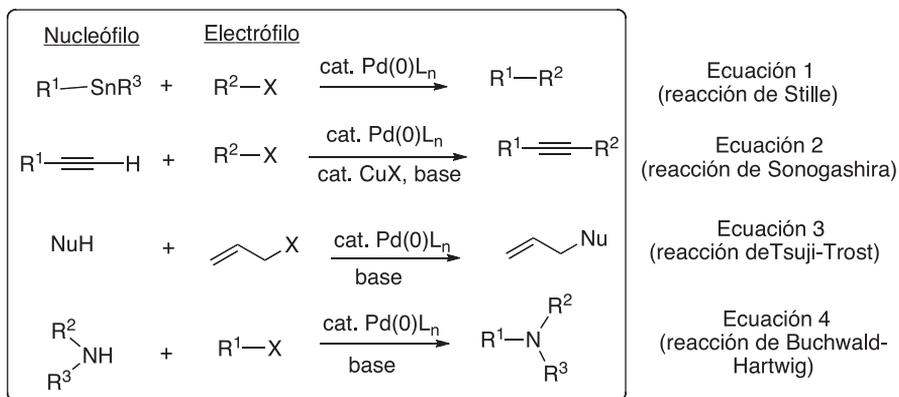
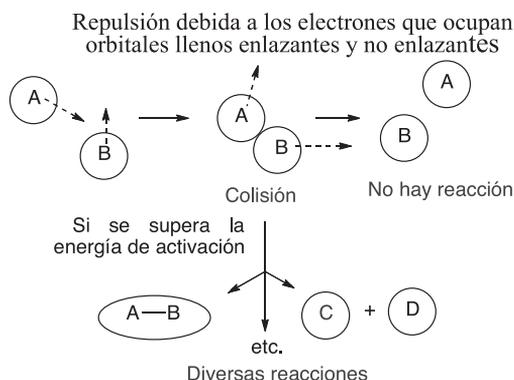


Figura 3. Ejemplos de otras reacciones de acoplamiento C-C catalizadas por Pd.

En general, se consideran más difíciles los acoplamientos catalizados por Pd con electrófilos de tipo alilo, bencilo y/o propargilo, así como con electrófilos que carecen de enlaces  $\pi$  próximos a dicho acoplamiento.

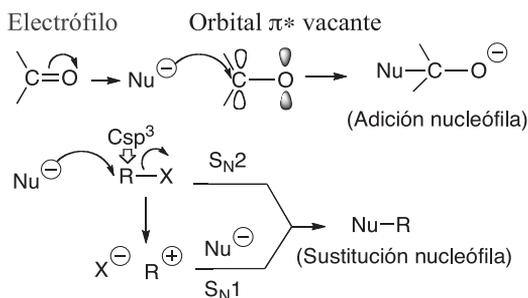
## 5. REACCIONES ORGÁNICAS DIFÍCILES O “IMPOSIBLES” UTILIZANDO MÉTODOS CLÁSICOS

Aunque los métodos clásicos de Síntesis Orgánica siguen teniendo plena vigencia, existen reacciones difíciles o “imposibles” que requieren la utilización de métodos novedosos. En general, para que el choque de dos moléculas A y B sea productivo, hay que superar la energía de activación de la reacción deseada. Si no hay complementariedad electrónica, las fuerzas de repulsión son las predominantes debido a la presencia de los electrones que ocupan orbitales llenos enlazantes y no enlazantes. Dicha complementariedad puede derivarse de que A y B posean dipolos opuestos con la consiguiente atracción electrostática, pero con mayor frecuencia se produce cuando A posee un orbital lleno (nucleófilo) y B otro vacante de baja energía (electrófilo). El nucleófilo A puede estar cargado negativamente o poseer un par de electrones no compartidos en un orbital de alta energía (Figura 4).



**Figura 4. Colisiones intermoleculares improductivas y productivas.**

Para la formación de enlaces C-C, la síntesis orgánica clásica utiliza como nucleófilos compuestos que poseen un átomo de carbono con una gran densidad de carga negativa. Los más frecuentes son organometálicos que contienen un metal enlazado con un átomo de carbono, como los reactivos litiados (RLi ó ArLi) o los ya mencionados magnesianos de Grignad (RMgX ó ArMgX). Por otra parte, aunque son muy pocas las especies que poseen orbitales enlazantes vacantes, existen muchos electrófilos de carbono, entre los que se encuentran moléculas con orbitales antienlazantes de baja energía. En la Figura 5 se representan dos tipos de reacción muy frecuentes en síntesis: la adición de nucleófilos a aldehídos o cetonas y la sustitución nucleó-



**Figura 5. Ejemplos de reacciones de adición y de sustitución entre un nucleófilo y un electrófilo.**

fila en sus variedades:  $S_N1$  y  $S_N2$ . El grupo carbonilo posee un orbital  $\pi^*$  (antienlazante) de baja energía que está vacante, por lo que puede adicionar nucleófilos. En los haluros o triflatos de alquilo el enlace está polarizado y, además, los aniones haluro o triflato son buenos grupos salientes por ser muy estables. Tanto en la adición a grupos CO como en la sustitución nucleófila, se forma un enlace C-C cuando el nucleófilo (Nu) es un compuesto organolítico o un reactivo de Grignard.

Sin embargo, algunas reacciones como por ejemplo la sustitución nucleófila con haluros o triflatos de arilo, heteroarilo o vinilo, son “imposibles” o tienen muchas limitaciones. La reacción  $S_N2$  es “imposible” porque el nucleófilo tiene que atacar desde dentro del benceno, que es donde se localiza el lóbulo mayor del orbital antienlazante  $s^*$ , mientras que la reacción  $S_N1$ , dada la inestabilidad del catión intermedio, sólo es posible cuando se realiza con sales de arildiazonio en las que el grupo saliente es nitrógeno molecular altamente estable (Figura 6).

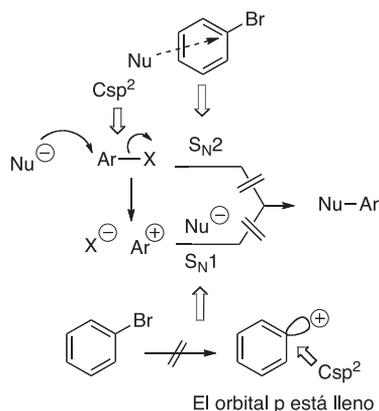


Figura 6. Ejemplos de reacciones “imposibles” o difíciles.

## 6. METALES DE TRANSICIÓN. EL PALADIO COMO CATALIZADOR

Los reactivos y complejos que contienen metales de transición han ampliado muchísimo el horizonte de la Síntesis Orgánica al permitir

acoplamientos C-C cuya formación estaba muy limitada en la química clásica. Muchas industrias los utilizan de forma rutinaria, siendo el Pd el metal de transición más empleado. Los complejos de Pd catalizan una gran variedad de reacciones con menos limitaciones que otros métodos (versatilidad), toleran la presencia de muchos grupos funcionales sin necesidad de protegerlos y desprotegerlos (tolerancia), las reacciones suelen producirse con gran regio- y quimio-selectividad (selectividad), y en presencia de ligandos quirales pueden generarse uno o más centros asimétricos (enantioselectividad). Dado que su mayor inconveniente es el precio, ha sido necesario desarrollar catalizadores o precatalizadores que posean una actividad catalítica elevada, próxima a la de las reacciones enzimáticas. Esta actividad se cuantifica por el "turnover number" (TON), que se define como el número de moles de sustrato que convierte un mol de catalizador antes de que éste se inactive. Aunque un catalizador de Pd puede costar alrededor de 1000 \$/mol, si el valor TON de una reacción es 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> el coste real sería de 1-10 \$/mol. Sus estados de oxidación más útiles son Pd(0) y Pd(II), y puede utilizarse en ausencia o en presencia de otros metales. Dadas las ventajas del Pd, la síntesis de la mayoría de las moléculas orgánicas complejas implica en la actualidad su presencia en uno o más pasos.

La Figura 7 representa el sistema periódico de los elementos y vemos que el Pd posee 10 electrones de valencia, por lo que necesita coordinarse con ligandos que le cedan 8 electrones, ya que éste es el número de electrones que le faltan para adquirir la configuración de los gases nobles (estos elementos tienen 18 electrones que están situados en los orbitales 1s, 5d, y 3p).

En la Figura 8 se ha representado uno de los complejos de Pd(0) con 18 electrones más frecuentemente empleados: tetraquis(trifenilfosfina)Pd(0). Junto a él se muestra un complejo de Pd(II): dicloruro de bis(acetonitrilo)Pd(II). Éste es un ejemplo de complejo "estable" que posee 16e, ya que las dos moléculas de acetonitrilo le ceden 4 (los 2 pares de electrones no compartidos situados en los átomos de nitrógeno), pero en los otros dos ligandos un electrón de cada uno está compartido con otro del Pd. Este complejo, que se obtienen por adición de acetonitrilo al PdCl<sub>2</sub>, es soluble y posee una geometría plana con un orbital vacante perpendicular a dicho plano, al que pueden enlazarse otros ligandos.



seleccionar una de las dos caras enantiotópicas de un alqueno, resultando versiones asimétricas de la reacción de Heck. En la Figura 10 se representan algunos ejemplos de ligandos bidentados quirales *P,P* y *P,N*.

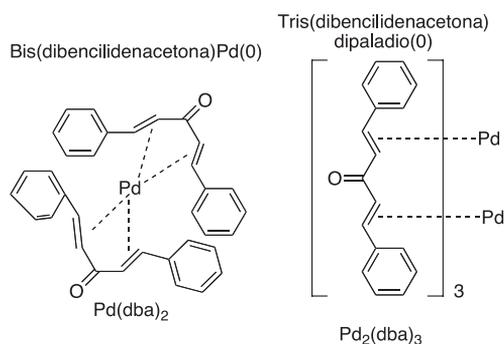


Figura 9. Algunos complejos  $\pi$  de Pd(0).

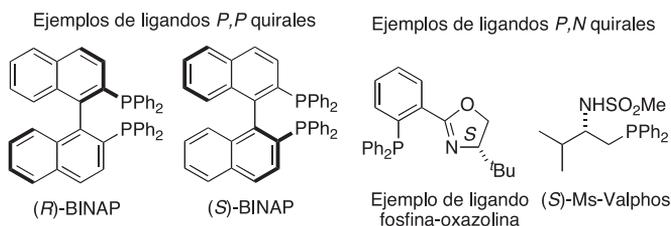


Figura 10. Algunos ligandos quirales bidentados.

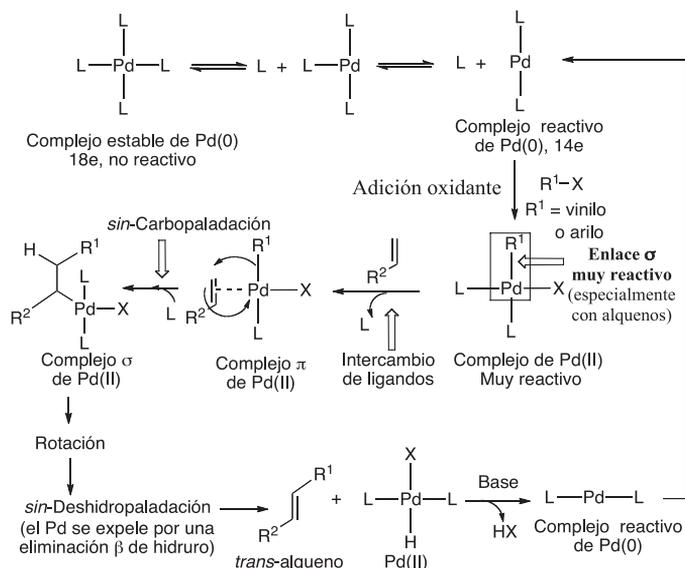
## 7. MECANISMOS PROPUESTOS

En los primeros años, los acoplamientos C-C catalizados por Pd resultaron bastante “misteriosos”, aunque poco a poco se ha ido imponiendo la racionalización. Comentaremos exclusivamente los que tienen mayor aceptación.

### 7.1. Mecanismo de la reacción de Heck y sus consecuencias

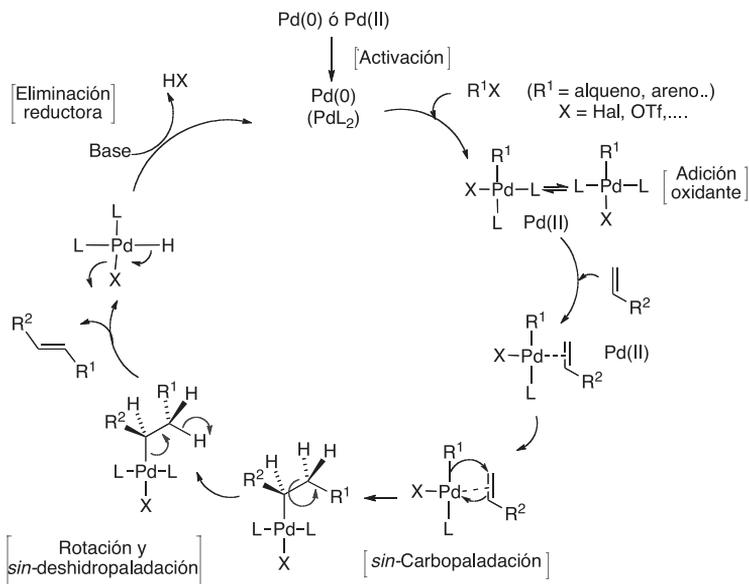
Se acepta que los complejos estables de Pd(0) se activan por la pérdida sucesiva de dos ligandos para dar el complejo de 14 electrones  $L_2Pd(0)$ , al que se adiciona un electrófilo ( $R^1X$ ) para dar un complejo de Pd(II) con 16 electrones (Figura 11). Este paso se denomina *adición oxidante*. Este complejo posee un lugar disponible para la coordinación que podría ser ocupado por una olefina (12), pero lo más probable es que la inserción de alqueno vaya precedida de la pérdida de un ligando para formar primero un complejo  $\pi$  que evoluciona a través de un estado de transición de 4 centros denominado *sin-carbopaladación*. En este proceso regio- y diatereoselectivo, la olefina se inserta en el enlace  $\sigma$   $R^1$ -Pd, situándose la cadena  $R^1$  y el Pd en una configuración *sin*. La regioquímica está gobernada principalmente por motivos estéricos de forma que  $R^1$  se enlaza al carbono menos impedido de la olefina. Aunque son posibles reacciones con alquenos tetrasustituidos (13) generalmente se utilizan etilenos mono y 1,1-disustituidos. A continuación ha de producirse la rotación del enlace C-C, que primitivamente era un doble enlace, a fin de situar uno de los átomos de hidrógeno que se encuentran en posición  $\beta$  respecto al átomo de Pd en una conformación eclipsada con éste (*sin*). Esta geometría permite la eliminación de dicho átomo como hidruro, la ruptura del enlace C-Pd con la formación de un complejo  $L_2HXPd(II)$ , y la salida de la nueva olefina  $R^2-C=C-R^1$ . A este paso se le denomina *sin-deshidropaladación*. Sólo falta que la base presente en la reacción elimine HX del complejo  $L_2HXPd(II)$  para regenerar el complejo reactivo  $L_2Pd(0)$ . Una limitación inherente al proceso es la inestabilidad del complejo  $L_2Pd(II)XR^1$  si  $R^1$  posee un átomo de hidrógeno en la posición  $\beta$ .

Las especies catalíticas activas de Pd(0) pueden formarse también *in situ* a través de la reducción en el medio de reacción de una especie de Pd(II) efectuada por ligandos de fosfina o por una trialquilamina. Las bases implicadas en la regeneración del catalizador tras la  $\beta$ -eliminación pueden ser orgánicas (trialquilaminas) o inorgánicas ( $NaHCO_3$ ,  $NaOAc$ ,  $K_2CO_3$ ,  $KOAc$ , etc.), los disolventes suelen ser orgánicos aunque a veces pueden mezclarse con agua e incluso utilizar sólo agua, y en algunos casos se utilizan sales de amonio cuaternario como aditivos (14). El esquema completo suele visualizarse de un modo algo más simple en forma de ciclo catalítico, como se muestra en la Figura 12.



**Figura 11. Mecanismo propuesto para la reacción de Heck entre un alqueno ( $R^2-C=CH_2$ ) y un electrófilo ( $R^1-X$ ).**

Cuando se utiliza el grupo triflato como grupo saliente ( $X = -OTf$ ), se entiende que la inserción del alqueno ocurre tras la disociación del triflato en el complejo formado tras la inserción oxidante originando un complejo catiónico. Esta circunstancia tiene gran importancia en la regioselectividad del proceso (12). Ya se ha dicho que la *sin*-carbopaladación suele estar gobernada por factores estéricos. Sin embargo, con alquenos polarizados la inserción del alqueno suele hacerse de forma que el Pd se enlaza al carbono de mayor densidad de carga y  $R^1$  lo hace con el carbono más pobre en electrones. Por ello, la regioselectividad del ataque a olefinas deficientes en electrones, que son las más eficaces y dan mayor regioselectividad (15), suele ser opuesto a la de olefinas ricas en electrones (para mayor información, ver la referencia 12). Los tres ejemplos representados en la Figura 13 corresponden a reacciones de Heck entre haluros de arilo y dobles enlaces con sustituyentes atractores (ecuaciones 1 y 2) o donadores de electrones (ecuación 3). En el último caso, debido a que el átomo de oxígeno es donador de electrones, el grupo fenilo del electrófilo se adiciona a la posición C-2 del sustrato en la *sin*-carbopaladación. En este intermedio, la rotación del enlace C(2)-C(3) no



**Figura 12.** Ciclo catalítico propuesto para la reacción de Heck entre un alqueno ( $\text{R}^2\text{-C=CH}_2$ ) y un electrófilo ( $\text{R}^1\text{-X}$ ).

está permitida por tratarse de un ciclo, por lo que no puede darse la *sin-deshidropaladación* con salida del átomo de hidrógeno en C-2, resultando obligada la salida del átomo de hidrógeno en C-4.

En una reacción análoga a la anteriormente comentada realizada con el mismo sustrato y triflato de 1-ciclohexenilo (Figura 14) se observa la misma regioselectividad, pero la presencia del catalizador quiral **1** derivado del ácido cetopícnico, permite obtener el enantiómero *R* con un exceso enantiomérico del 94%, lo que significa que sólo se obtiene un 3% del enantiómero *S* (**16**). Las reacciones de Heck asimétricas suelen dar excesos enantioméricos (*ee*) superiores al 80%, y en algunos casos por encima del 99%.

Ciertos alquenos bicíclicos no pueden dar acoplamientos de Heck debido a que la *sin-deshidrohalogenación* final no es posible por razones geométricas. En estos casos, tras la *sin-carbopaladación* pueden realizarse otras reacciones como por ejemplo la reducción. En la Figura 15 se esquematiza una reacción de hidroarilación utilizada en la síntesis enantioselectiva del analgésico natural (*R*)-epibatidina.

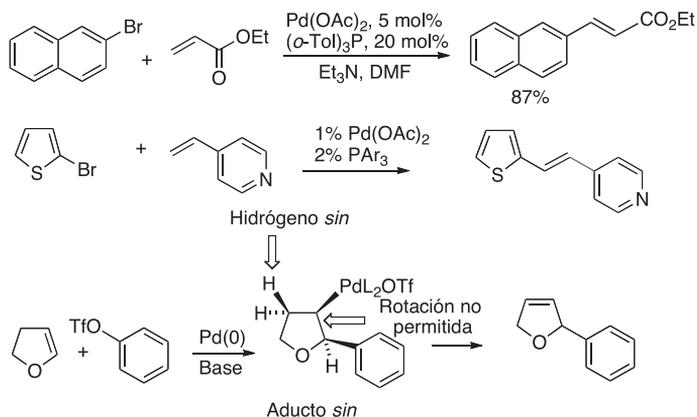


Figura 13. Regioselectividad de las reacciones de Heck.

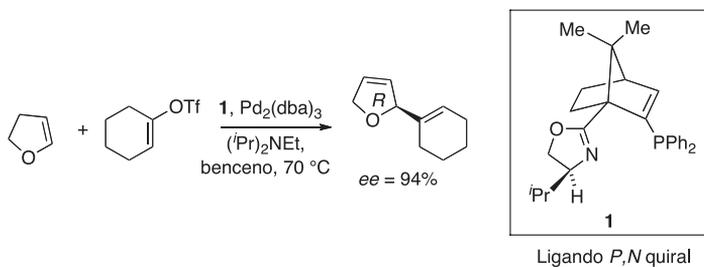


Figura 14. Ejemplo de un acoplamiento de Heck enantioselectivo.

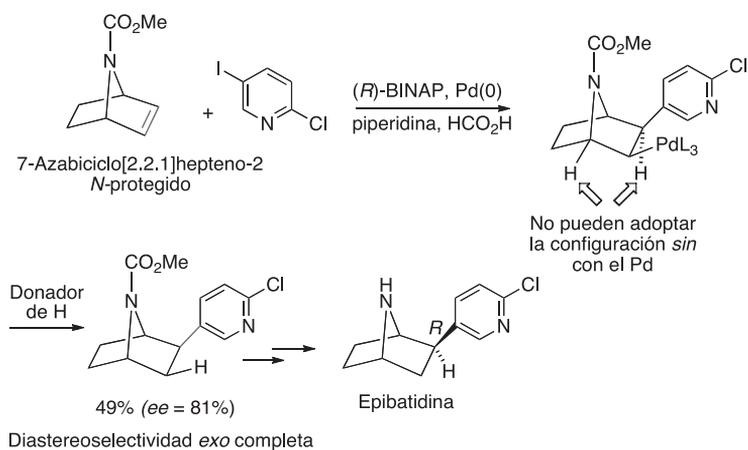


Figura 15. Síntesis enantioselectiva de (*R*)-epibatidina.

## 7.2. Acoplamientos de Negishi

En el periodo 1977-1978 Negishi y colaboradores publicaron diversas reacciones de alquínilación entre alquínilzinc y 1-haloalquinos catalizadas por Pd. Existen muchas variantes en las que se emplean diferentes reactivos organozincicos y diversos electrófilos (17). Aquéllos suelen obtenerse a partir de compuestos organolíticos por transmetalación con  $\text{ZnCl}_2$ . Los derivados alquínillitio son insatisfactorios para el acoplamiento porque son tan nucleófilos que envenenan los catalizadores de Pd al desplazar a los ligandos de fosfina (18). En la Figura 16 se señalan las diferencias entre los acoplamientos con alquinos de Heck, Sonogashira y Negishi y se resume uno de los mecanismos más aceptados para racionalizar este último. En el proceso de *carbopaladación* el alquino o el alquínilmetal ( $\text{M} = \text{ZnCl}$  en los acoplamientos de Negishi) se adiciona oxidativamente al complejo reactivo  $\text{Pd(0)L}_2$  originando el complejo  $\text{RPd(II)L}_2\text{X}$ , al que se adiciona el alquino. La posterior *eliminación reductora* da lugar al alquino sustituido y regenera el catalizador reactivo.

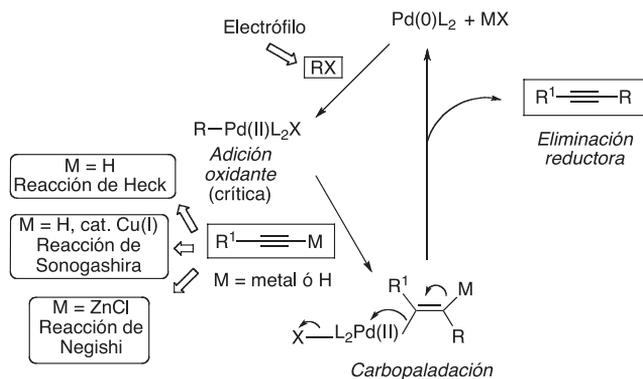


Figura 16. Mecanismo propuesto para el acoplamiento de Negishi entre un alquínilzinc y un electrófilo.

## 7.3. Acoplamientos de Suzuki

Estas reacciones son muy atractivas porque su desarrollo es sencillo y por la estabilidad de los precursores, generalmente ácidos bóricos o boronatos. Los otros componentes son un haluro o triflato

de arilo, un catalizador de Pd(0), y una base como NaOEt, NaOH,  $K_2CO_3$ , o KF (Figura 17). Las diferentes variantes de los acoplamientos de Suzuki han permitido una enorme cantidad de aplicaciones ya que los electrófilos no están restringidos a derivados de arilo, pudiendo utilizarse derivados de alquilos, alquénilos y alquinilos. Por ello, además de la síntesis de biarilos esta reacción permite la construcción de dienos conjugados con gran pureza diastereoisomérica.

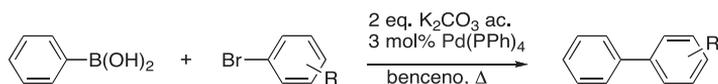


Figura 17. Síntesis de biarilos por acoplamiento de Suzuki.

Los organoboranos de partida son fácilmente accesibles por hidrobromación de alquenos y alquinos o por la borilación de haluros de arilo (19), la estereoquímica de los grupos alquénilo situados en el reactivo de organoborano y en el electrófilo se retiene en los productos, tolera la presencia de diversos grupos funcionales, las reacciones son muy versátiles, y se producen con altos “turnovers” (20). Uno de los mecanismos aceptados para los acoplamientos de Suzuki se resume en la Figura 18.

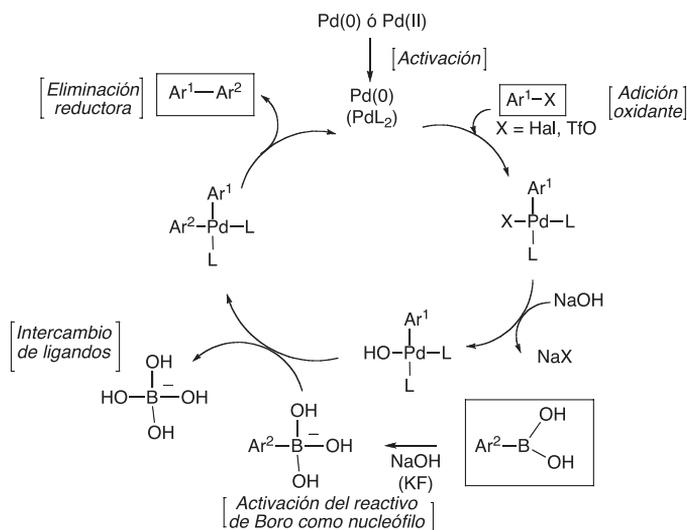


Figura 18. Mecanismo propuesto para la reacción de Suzuki entre un electrófilo aromático y un ácido arilborónico.

Éste se inicia con la adición oxidante de un electrófilo aromático  $XAr^1$  ( $X =$  haluro o triflato generalmente) al complejo activado  $L_2Pd(0)$  para dar el complejo  $L_2Pd(II)XAr^1$ . El ligando  $X$  se intercambia por  $OH$  por reacción con la base originando el complejo  $L_2Pd(II)(OH)Ar^1$  y, a su vez, ésta reactiva al ácido arilborónico como nucleófilo ya que el boro posee un orbital  $d$  vacío y puede adicionar electrones. Un segundo intercambio de ligandos con salida del grupo  $OH$  genera el complejo  $L_2Pd(II)Ar^2Ar^1$ , que colapsa por una eliminación reductora para dar el biarilo  $Ar^2-Ar^1$  y regenerar el catalizador.

## 8. APLICACIONES DE LAS REACCIONES DE HECK. ALGUNOS EJEMPLOS

La reacción de Heck se ha convertido en una de las herramientas sintéticas más potentes para construir esqueletos moleculares complejos a partir de precursores sencillos. Es frecuente utilizarla en uno o varios de los pasos clave en la síntesis de productos naturales, especialmente en reacciones intramoleculares en las que está favorecida la formación de anillos de 5 eslabones y en su mayoría proceden de modo *exo-trig* ya que el modo *endo-trig* requiere una cadena flexible que permita la conformación adecuada (21).

La Academia ha destacado la síntesis de discodermolida (Figura 19), un poliquétido con un mecanismo de acción semejante al de las epotilonas o el paclitaxel, que se aisló en 1990 de la esponja marina *Discodermia dissoluta* con un 0,002% de rendimiento. Debido a su pro-

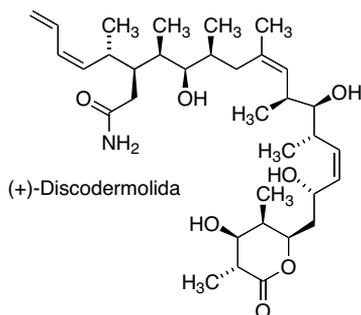
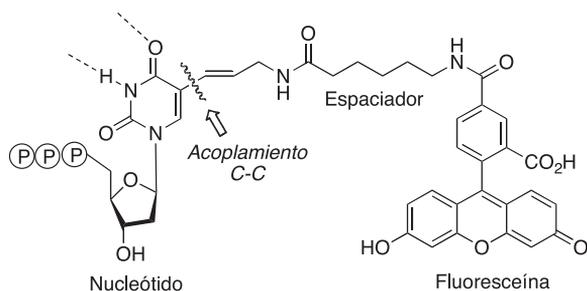


Figura 19. Estructura de (+)-discodermolida.

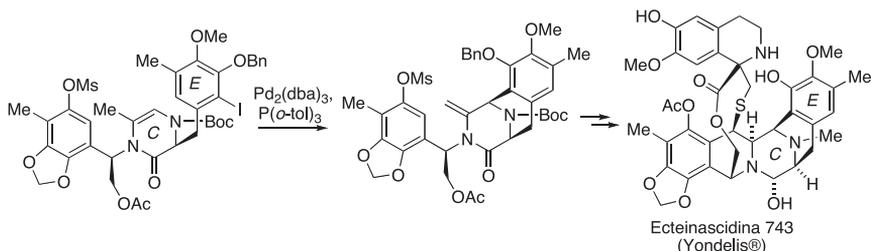
metedor futuro como fármaco anticanceroso, ha mostrado valores  $IC_{50} = 3-80$  nM, su estudio clínico requirió su síntesis total que ha sido posible gracias al empleo de la química del Pd (22).

En Biología se ha utilizado la reacción de Heck en la síntesis de sondas no radioactivas (*Nonisotopic labeling*) (23) para acoplar colorantes fluorescentes a oligonucleótidos que poseen una secuencia complementaria a una región específica del polinucleótido (ADN o ARN) (24). Los conjugados aminoalil-dUTP pueden incorporarse al ADN utilizando técnicas enzimáticas convencionales (Figura 20).



**Figura 20.** Aplicación de la reacción de Heck para la fabricación de sondas de ADN.

En la síntesis total de ecteinascidina-743 desarrollada por Fukuyama (25), el paso clave es el acoplamiento entre dos anillos a través de una reacción de Heck intramolecular entre un yoduro de arilo (anillo E) y una olefina (anillo C) (Figura 21).



**Figura 21.** Utilización de una reacción de Heck intramolecular como paso clave en la síntesis total de ET-743.

Son especialmente relevantes los procesos en cadena como el que se esquematiza en la Figura 22 para una síntesis total de (-)-morfina (26). Ésta se inicia con una inserción de Heck intramolecular, que forma un intermedio de  $\pi$ -alilpaladio al que se adiciona el hidroxilo fenólico libre (nuclófilo). Los dos ciclos así formados completan el esqueleto de los alcaloides opiáceos, desde el que se llega a (-)-morfina a través de algunas modificaciones.

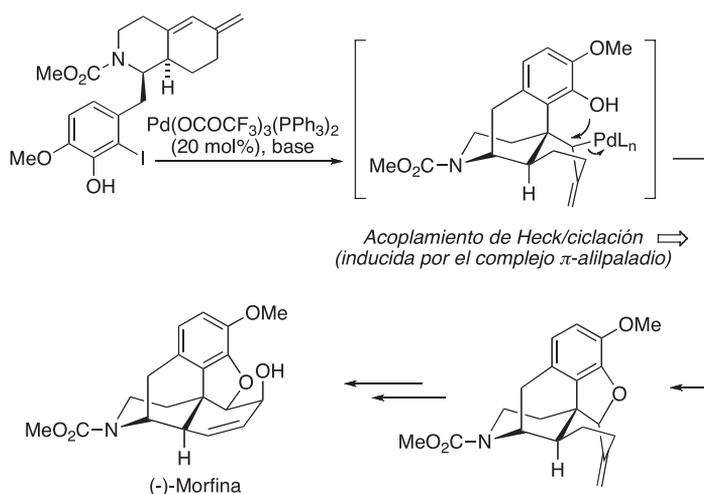


Figura 22. Procesos en cadena aplicados a la síntesis de (-)-morfina.

En una síntesis concisa del alcaloide del género *Strychnos* ( $\pm$ )-deshidrotubifolina, la *adición oxidante* del sistema tetracíclico indicado en la Figura 23 seguida de una inserción de Heck con la subsecuente deshidropaladación, origina un compuesto tetracíclico que se encuentra en equilibrio tautomérico siendo la ( $\pm$ )-deshidrotubifolina el tautómero mayoritario (27).

Una serie de acoplamientos en cascada que permiten la formación de 3 ciclos se muestra en la Figura 24. El derivado monocíclico de partida experimenta una *ciclación suprafacial paladio-eno*, el anión acetato es aquí el grupo saliente, para dar un intermedio de *sin-carbopaladación* con formación del anillo A. La subsecuente *inserción en el doble enlace* de la otra cadena forma el anillo C. Debido a la geo-

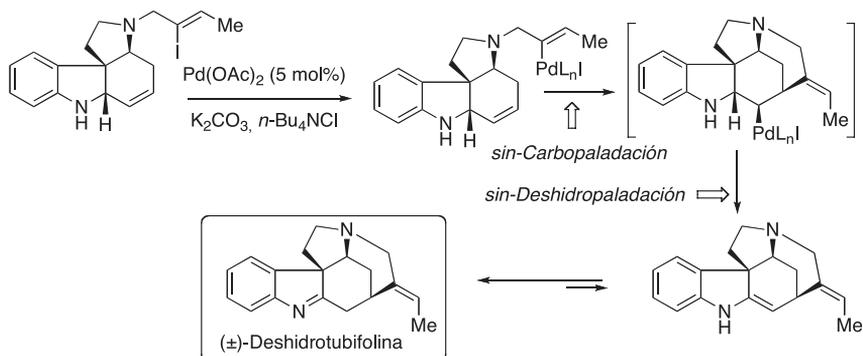


Figura 23. Síntesis de (±)-deshidrotubifolina.

metría de este segundo intermedio el Pd se dispone muy próximo al sustituyente vinilo por lo que, en vez de eliminarse el hidrógeno en la posición  $\beta$  respecto al paladio, éste experimenta una *segunda inserción de Heck intramolecular*, culminando el proceso con la formación de un compuesto tetracíclico por *sin-deshidropaladación* (28).

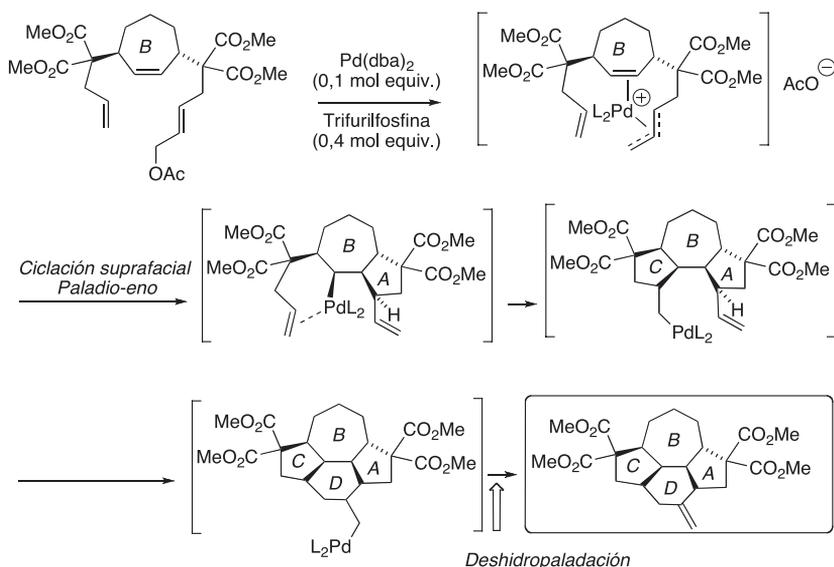


Figura 24. Proceso en cascada con formación de tres anillos.

Negishi realizó una elegante síntesis del esqueleto de los esteroides en una única operación a través de reacciones de Heck “dominó” (29). La *adición oxidante* del enlace C-I al complejo de Pd(0) inicia una cascada de *carbopalmadaciones* en las que se forman 4 enlaces C-C y 4 ciclos (Figura 25).

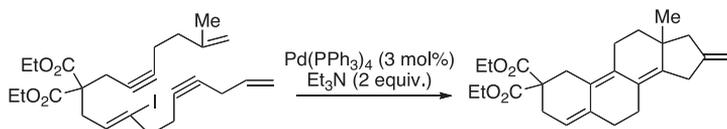


Figura 25. Cascada de carbopalmadaciones con formación de 4 enlaces C-C.

## 9. APLICACIONES DE LA REACCIÓN DE NEGISHI. EJEMPLOS

La Figura 26 muestra una serie de reacciones en cascada en la que se obtiene en primer lugar un dienino por un doble acoplamiento de Negishi. El derivado organozincico del enino así producido se obtiene por transmetalación del derivado organolítico con  $ZnCl_2$ . Finalmente, éste sufre un tercer acoplamiento con yodobenceno para dar el enodiino correspondiente (30).

La Figura 27 muestra un doble acoplamiento de Negishi utilizado para la síntesis de otro tipo de enodiinos (31). Algunos de los antibió-

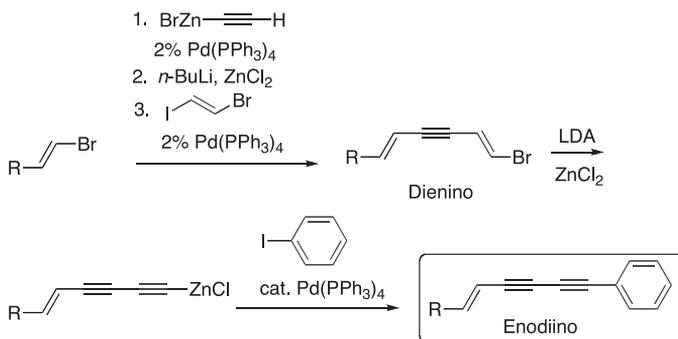


Figura 26. Reacciones de Negishi en cascada. Síntesis de enodiinos.

ticos antitumorales más activos, aunque con muchas limitaciones por su toxicidad, son compuestos aislados de diferentes microorganismos que tienen esta porción estructural. Entre ellos se encuentran neocarzinostatina, esperamicina A<sub>1</sub>, dinemicina A, calicheamicina  $\gamma_1$ , o uncialamicina, cuya actividad se atribuye a la capacidad del fragmento (*Z*)-3-eno-1,5-diino para producir un diradical en la posición *para* de un benceno a través de una cicloaromatización, que origina la ruptura del ADN (32). Esta propiedad se explota en microelectrónica para fabricar polímeros a partir de enodios estables en la oscuridad pero que se activan por la luz.

En la Tabla 2 se muestran otros de los muchos productos naturales que se han sintetizado utilizando acoplamientos de Negishi, entre ellos la epotilona B, que se aprobó como fármaco huérfano en el cáncer de ovario.

La síntesis del coenzima Q<sub>10</sub>, a través de una serie de acoplamientos de Negishi en cascada (33), se muestra en la Figura 28.

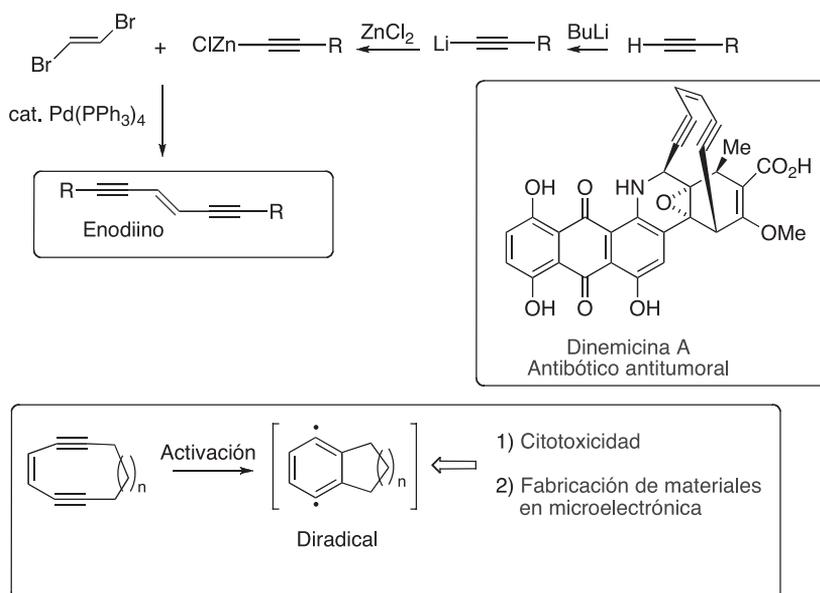
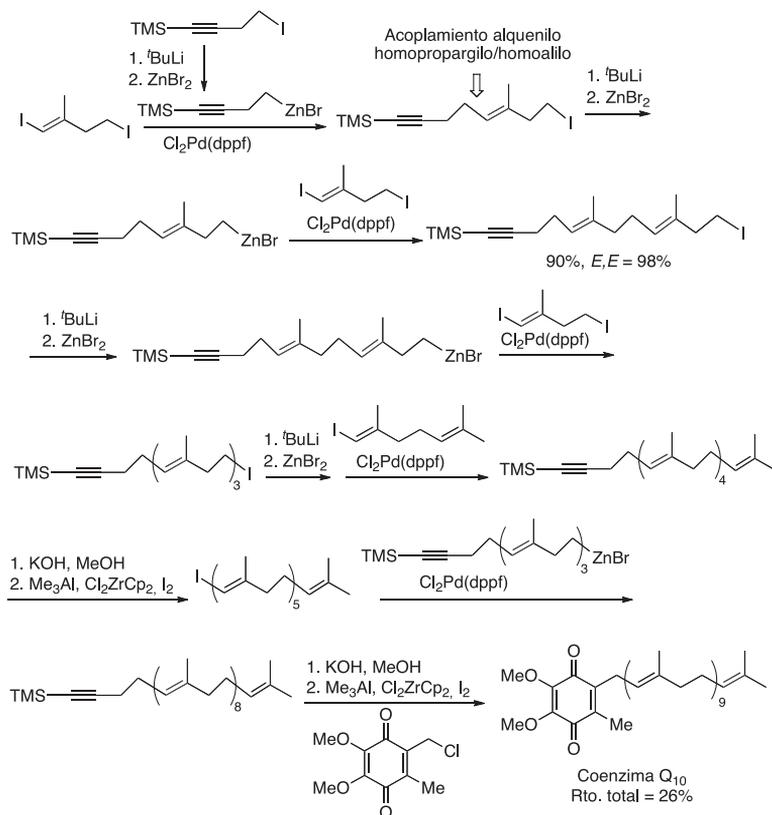


Figura 27. Reacciones de Negishi que conducen a enodios. Propiedades.

Tabla 2. Algunos productos sintetizados utilizando reacciones de Negishi.

Año	Producto natural	Autor principal
1980	Dendrolasina	Negishi, E.
1987	(±)-Agelina A	Tokoroyama, T.
1989	(-)-Discodermolida	Smith, A. B.
1995	(+)-Anfidinolida J	Williams, D. R.
1998	Brevetoxina A	Nicolaou, K. C.
1999	(-)-Epotilona B	Schinzer, D.
2002	Coenzimas Q <sub>3</sub> y Q <sub>10</sub>	Negishi, E.
2004	Delactomicina	Panek, J. S.
2005	Sifonarienona	Negishi, E.

Figura 28. Síntesis del coenzima Q<sub>10</sub>.

## 10. ALGUNAS APLICACIONES DE LA REACCIÓN DE SUZUKI

Muchos compuestos que tienen en su estructura un grupo biarilo se sintetizan a través de reacciones de Suzuki, por ejemplo los antihipertensivos del grupo de los sartanes, antagonistas no peptídicos del receptor de angiotensina II (34) (Figura 29).

Otros ejemplos corresponden a insecticidas como el nicobifeno, o a los antibióticos peptídicos diazonamida A y bifenomina B (Figura 30). La diazonamida A, aislada de una ascidia marina, inhibe líneas celulares de varios carcinomas por inhibir la formación de microtúbulos.

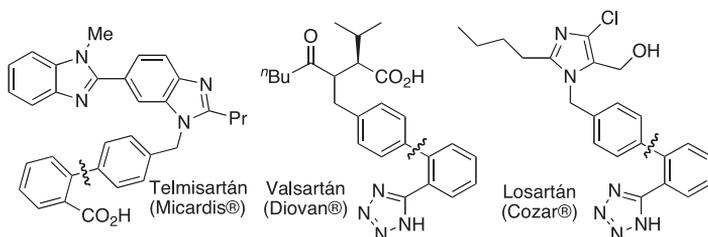


Figura 29. Estructura de algunos sartanes.

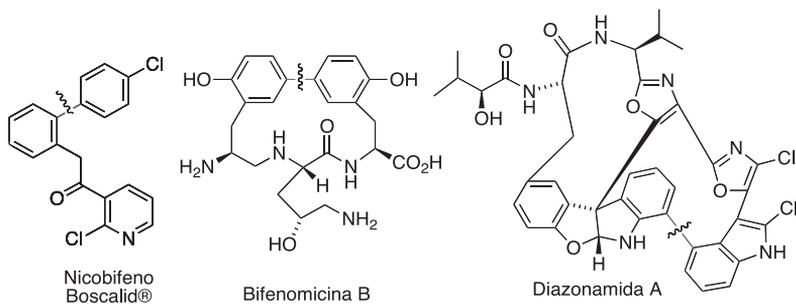
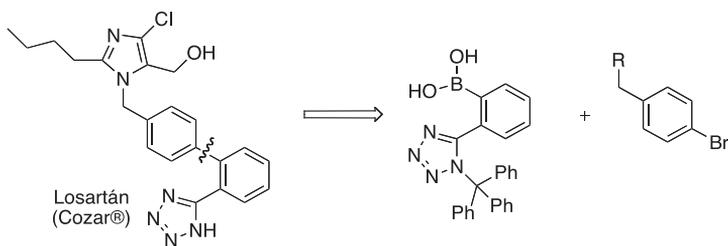


Figura 30. Otros compuestos sintetizados por reacciones de Suzuki.

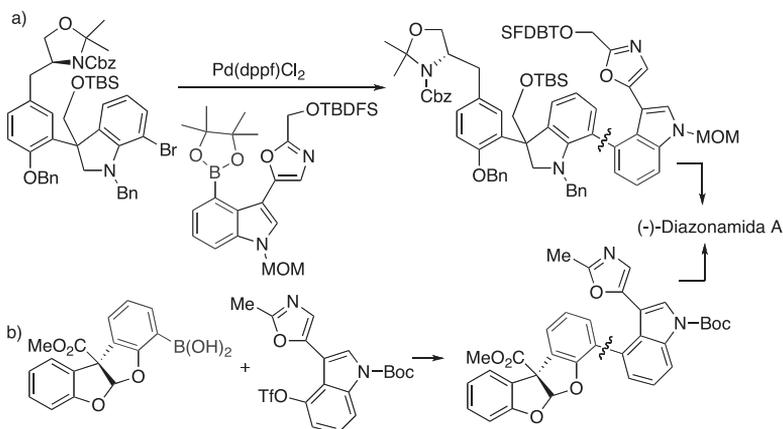
El acoplamiento biarílico que suele emplearse en la síntesis de losartán por ejemplo, implica la reacción del ácido 1-tritil-1,2,3,4-tetrazol-5-il-fenil borónico con un bromobenceno sustituido en la posición *para* (35) (Figura 31).



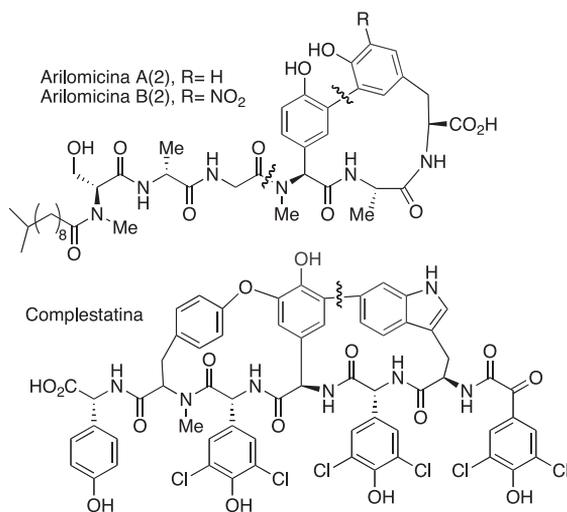
**Figura 31. Retrosíntesis de Losartán.**

Un acoplamiento de Suzuki-Miyaura y una macrolactamización con alto rendimiento que forma el macrociclo tensionado de 14 eslabones, son dos pasos clave en la síntesis del dipéptido cíclico bifenómica B (36). En la Figura 32 se esquematizan los pasos clave de dos síntesis de (-)-diazonamida A, una de ellas utiliza el acoplamiento de Suzuki en una etapa muy avanzada (37), mientras que en la otra se realiza en uno de los primeros pasos (38).

Otros ejemplos interesantes en la utilización del acoplamiento de Suzuki se encuentran en la síntesis de tres antibióticos lipopeptídicos aislados de *Streptomyces*: arilomicinas A<sub>2</sub> y B<sub>2</sub> (39) y complestatina (40) (Figura 33). Las dos primeras inhiben la SPasa I bacteriana, una proteasa de serina esencial para todas las bacterias, por lo que podrían



**Figura 32. Acoplamientos de Suzuki. Precursores de (-)-diazonamida.**



**Figura 33. Acoplamiento de Suzuki en arilomicinas y complestatina.**

ser candidatas para el desarrollo de nuevos antibióticos. La complestatina es un péptido antagonista no competitivo de NMDA, AMPA y ácido kaínico que, al bloquear la entrada de Ca<sup>2+</sup>, protege a las neuronas corticales de la muerte por isquemia.

Un acoplamiento de Suzuki es también un paso clave en la síntesis del sesquiterpeno humuleno, formado por un ciclo triinsaturado de 11 eslabones (41) (Figura 34a), y en la del éster metílico del ácido (5*S*,6*R*)-dihidroxieicohexatrienoico [(5*S*,6*R*)-diHETE], un prostanoides agonista del receptor LTD<sub>4</sub> (42) (Figura 34b).

## 11. APLICACIONES INDUSTRIALES

Los acoplamientos C-C catalizados por Pd se utilizan en la industria para producir fungicidas, protectores solares, o diodos emisores de luz, entre otros. En relación con la industria farmacéutica han sido una verdadera revolución. Por ejemplo, la reacción de Heck se utiliza en la síntesis del antiinflamatorio no esteroídico naproxeno, el antiastmático montelukast, y el herbicida prosulfuron (Figura 35).

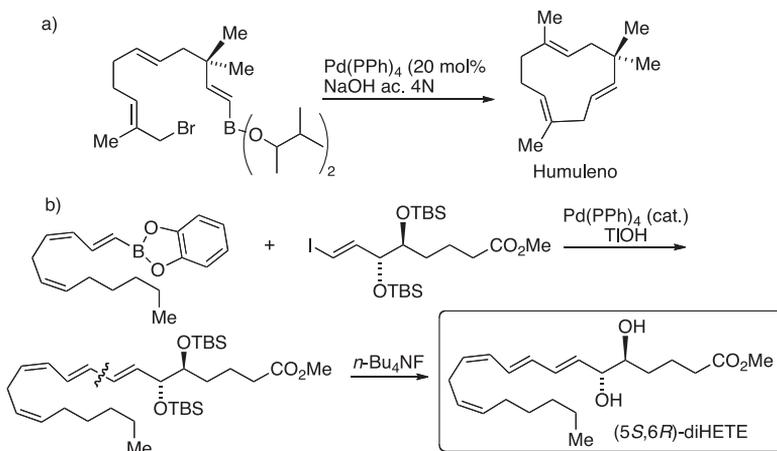


Figura 34. Otras aplicaciones del acoplamiento de Suzuki.

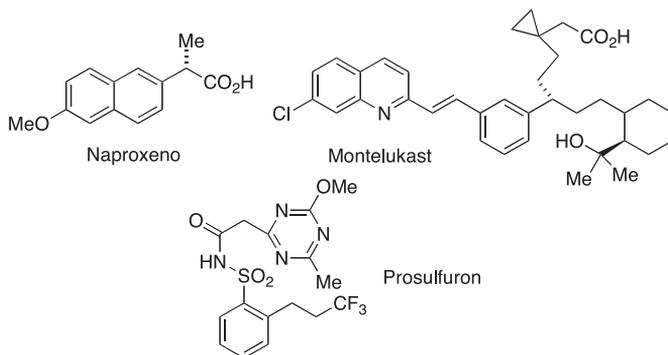


Figura 35. Algunos compuestos industriales obtenidos por la reacción de Heck.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Nicolaou, K. C., Bulger, P. G. & Sarlah, D. (2005) Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reaction in Total Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44: 4442-4489.
2. Heck, R. F. (1968) Acylation, methylation, and carboxyalkylation of olefins by Group VIII metal derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 90: 5518-5526.

3. Heck, R. F. & Nolley Jr., J. P. (1972) Palladium-catalyzed vinylic hydrogen substitution reactions with aryl, benzyl, and styryl halides. *J. Org. Chem.* 37: 2320-2322.
4. Mizoroki, T., Mori, K. & Ozaki, A. (1971) Arylation of Olefin with Aryl Iodine Catalyzed by Palladium. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 44: 581-581.
5. a) Milstein, D. & Stille, J. K. (1978) A general, selective, and facile method for ketone synthesis from acid chlorides and organotin compounds catalyzed by palladium. *J. Am. Chem. Soc.* 100: 3636-3638. b) Li, J. J. (2009) Stille coupling. *Name Reactions.* 529-540.
6. Negishi, E., King, A. O. & Okukado, N. (1977) Selective carbon-carbon bond formation *via* transition metal catalysis. A highly selective synthesis of unsymmetrical biaryls and diarylmethanes by the nickel- or palladium-catalyzed reaction of aryl- and benzylzinc derivatives with aryl halides. *J. Org. Chem.* 42: 1821-1823.
7. Sonogashira, K., Tohda, Y. & Hagihara, N. (1975) A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines. *Tetrahedron Lett.* 16: 4467-4470.
8. a) Miyaura, N., Yanagi, T. & Suzuki, A. (1981) The Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Phenylboronic Acid with Haloarenes in the Presence of Bases. *Synth. Commun.* 11: 513-519. b) Suzuki, A. (1985) Organoboron compounds in new synthetic reactions. *Pure&Applied Chemistry.* 57: 1749-1758. c) Miyaura, N., Ishikawa, M., Sasaki, H., Ishikawa, M., Satoh, M. & Suzuki, A. (1989) Palladium-catalyzed inter- and intramolecular cross-coupling reactions of B-alkyl-9-borabicyclo[3.3.1]-nonane derivatives with 1-halo-1-alkenes or haloarenes. Syntheses of functionalized alkenes, arenes, and cycloalkenes *via* a hydroboration-coupling sequence. *J. Am. Chem. Soc.* 111: 314-321. d) Miyaura, N. & Suzuki, A. (1997) Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* 95: 2457-2483.
9. Negishi, E., Wang, G., Rao, H. & Xu, Z. (2010) Alkyne Elementometalation-Pd-Catalyzed Cross-Coupling. Toward Synthesis of All Conceivable Types of Acyclic Alkenes in High Yields, Efficiently, Selectively, Economically, and Safely: Green Way. *J. Org. Chem.* 75: 3151-3182.
10. Fujiwara, Y., Moritani, I., Danno, S., Asano, R. & Teranishi, S. (1969) Aromatic substitution of olefins. VI. Arylation of olefins with palladium(II) acetate. *J. Am. Chem. Soc.* 91: 7166-7169.
11. Entre el gran número de revisiones, véase: a) de Meijere, A. & Bräse, S. (2004) "*Metal Catalyzed Cross-Coupling Reactions*", 2<sup>a</sup> ed., Diederich, F., de Meijere, A., Eds., Wiley-VCH, Weinheim. b) Beller, M., Zapf, A. & Riermeyer, T. H. (2004) "*Transition Metals for Organic Synthesis*", 2<sup>a</sup> ed., Beller, M. & Bolm, C., Eds., Wiley-VCH, Weinheim, vol. 1, p. 271.
12. Cabri, W. & Candiani, I. (1995) Recent Developments and New Perspectives in the Heck Reaction. *Acc. Chem. Res.* 28: 2-7.
13. Nilsson, P., Larhed, M. & Hallberg, A. (2003) A New Highly Asymmetric Chelation-Controlled Heck Arylation. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 3430-3431.
14. Jeffery, T. (1996) On the Efficiency of Tetraalkylammonium Salts in Heck Type Reactions. *Tetrahedron*, 52: 10113-10130.

15. Para conocer las condiciones de reacción con alquenos ricos en electrones ver por ejemplo: Mo, J. & Xiao, J. (2006) The Heck Reaction of Electron-Rich Olefins with Regiocontrol by Hydrogen-Bond Donors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45: 4152-4157.
16. Gilbertson, S. R. & Fu, Z. (2001) Chiral *P,N*-Ligands Based on Ketopinic Acid in the Asymmetric Heck Reaction. *Org. Lett.* 3: 161-164.
17. Tan, Z. & Negishi, E. (2002) "Handbook of Organopalladium Chemistry for organic synthesis"; Negishi, E., Ed.; Wiley, New York, pp. 863-942.
18. Negishi, E. (2005) The Negishi coupling. An Update. *Aldrichimica Acta.* 38: 71-92.
19. Miyaura borilation (2006) *Name Reactions.* 392-393.
20. Oh-e, T., Miyaura, N. & Suzuki, A. (1993) Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Organoboron Compounds with Organic Triflates. *J. Org. Chem.* 58: 2201-2208.
21. Nicolaou, K. C. & Sorensen, E. J. (1996) "Classics in total Synthesis". VCH, Weinheim, pp. 566-578.
22. Mickel, S. J. (2002) *Strategies and tactics in Organic Synthesis*, Elsevier, Amsterdam, ed. M. Harmata, volumen 6, capítulo 9.
23. a) Kricka L. J. (1992) "Nonisotopic DNA Probing Techniques". Academic Press, San Diego, C. A. b) Hauland, R. P. (2005) "Molecular Probes®: The Handbook" 11ª edición, "Nucleic Acid Detection and Analysis", cap. 8, Sección 8.2.
24. Brown, P. O. & Botstein, D. (1999) Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature America.* 33-37.
25. Endo, A., Yanagisawa, A., Abe, M., Tohma, S., Kan, T. & Fukuyama, T. (2002) Total Synthesis of Ecteinascidin 743. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 6552-6554.
26. Overman, L. E. (1994) Application of intramolecular Heck reactions for forming congested quaternary carbon centers in complex molecule total synthesis. *Pure & Applied Chemistry.* 66: 1423-1430.
27. Rawal, V. H., Michoud, C. & Monestel, R. F. (1993) General strategy for the stereocontrolled synthesis of *Strychnos* alkaloids: a concise synthesis of ( $\pm$ )-dehydrotubifoline. *J. Am. Chem. Soc.* 115: 3030-3031.
28. Oppolzer, W. & De Vita, R. J. (1991) Direct syntheses of polyfused ring systems by intramolecular tandem palladium-ene/Heck insertion reactions. *J. Org. Chem.* 56: 6256-6257.
29. Zhang, Y. & Negishi, E. (1989) Metal-promoted cyclization. Palladium-catalyzed cascade carbometalation of alkynes and alkenes as an efficient route to cyclic and polycyclic structures. *J. Am. Chem. Soc.* 111: 3454-3456.
30. Negishi, E., Alimardanov, A. & Xu, C. (2000) An Efficient and Stereoselective Synthesis of Xerulin via Pd-Catalyzed Cross Coupling and Lactonization Featuring (*E*)-Iodobromoethylene as a Novel Two-Carbon Synthone. *Org. Lett.* 2: 65-67.
31. Negishi, E., Hata, M. & Xu, C. (2000) A Strictly "Pair"-Selective Synthesis of Conjugated Diynes via Pd-Catalyzed Cross Coupling of 1,3-Diynylzincs: A Superior Alternative to the Cadiot-Chodkiewicz Reaction. *Org. Lett.* 2: 3687-3689.
32. a) Kaneko, I., Kamoshida, K. & Takahashi, S. (1989) Antitumor activity of Dinemycin A and its triacetyl derivative. *J. Antibiot.* 44: 1306-1311. b) Myers, A. G., Fraley, N. J., Cohen, S. B. & Madar, D. J. (1995) Synthesis of (+)-dynemicin A and analogs of wide structural variability: establishment of the absolute con-

- figuration of natural dynemicin A. *Chem. Biol.* 2: 33-43. c) Avendaño, C. & Menéndez, J. C. (2008) "Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs", Ed. Elsevier, capítulo 4, sección 8, pp. 122-126.
33. Negishi, E., Liu, S.-Y., Xu, C. & Huo, S. (2002) A Novel Highly Selective, and General Methodology for the Synthesis of 1,5-Diene-Containing Oligoisoprenoids of All Possible Geometrical Combinations Exemplified by an Iterative and Convergent Synthesis of Coenzyme Q<sub>10</sub>. *Org. Lett.* 4: 261-264.
  34. Duncia, J. V., Chiu, A. T., Carini, D. J., Gregory, G. B., Johnson, A. L., Price, W. A., Wells, G. J., Wong, P. C., Calabrese, J. C. & Timmermans, P. B. M. W. M. (1990) The discovery of potent nonpeptide angiotensin II antagonists: a new class of potent antihypertensives. *J. Med. Chem.* 32: 1312-329.
  35. Waldmann, H., He, Y.-P., Tan, H., Arve, L. & Arndt, H.-D. (1994) Efficient Synthesis of Losartan. A Nonpeptide Angiotensin II Receptor Antagonist. *J. Org. Chem.* 59. 6391-6394.
  36. a) Waldmann, H., He, Y. P., Arve, L. & Arndt, H. D. (2008) Flexible total synthesis of biphenomycin B. *Chem. Commun.* 43: 5562-5564. b) Carbonnelle, A.-C. & Zhu, J. (2000) A Novel Synthesis of Biaryl-containing Macrocycles by a Domino Miyaura Aryloboronate Formation: Intramolecular Suzuki Reaction. *Org. Lett.* 2: 3477-3480.
  37. a) Nicolaou, K. C., David, Y.-K., Chen, X.-H., Taotao, L., Marco, B. & Scott, A. S. (2004) Chemistry and Biology of Diazonamide A: A first total synthesis and confirmation of the true structure. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 12888-12896. b) Nicolaou, K. C., Juliang, H., Mali, V. R., Paraselli, B. R., Gerasimos, R., Scott, A. S., Xianhay, H., David, Y.-K., William, E. B., Gioseppone, N., Giannakakou, P. & O'Brete, A. (2004) Chemistry and biology of Diazonamide A: Second Total Synthesis and Biological Investigations. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 12897-12906.
  38. Vedejs, E. & Zajac, M. A. (2001) Synthesis of the Diazonamide A Macrocyclic core via a Dieckmann-Type Cycization. *Org. Lett.* 3: 2451-2454.
  39. Dufour, J., Neuville, L. & Zhu, J. (2010) Intramolecular Suzuki-Miyaura reaction for the total synthesis of signal peptidase inhibitors arylomycins A(2) and B(2). *Chem. Eur. J.* 16: 10523-10534.
  40. Jia, Y., Bois-Choussy, M. & Zhu, J. (2008) Synthesis of diastereomers of complestatin and chloropeptin I: Substrate-dependent atropstereoselectivity of the intramolecular Suzuki-Miyaura reaction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47: 4167-4172.
  41. Nicolaou, K. C., Ramphal, J. I., Palazon, J. M. & Spanevello, R. A. (1989) Stereocontrolled Total Synthesis of (5*S*,6*R*)-, (5*S*,6*S*)-, (5*R*,6*R*)-, and (5*R*,6*S*)-(7*E*,9*E*,11*Z*,14*Z*)-5,6-Dihydroxy-7,9,11,14-icosatetraenoic Acid (5,6-DiHETE) Methyl Esters. *Angew. Chem. Int. Ed.* 28. 587-588.
  42. Suzuki, A. (1985) Organoboron compounds in new synthetic reactions. *Pure&Applied Chemistry.* 57: 1749-1759.

**\* Información de contacto:**

Dra. María del Carmen Avendaño López.

Catedrática de Química Orgánica y Académica de Número de la RANF.

e-mail: avendano@farm.ucm.es



## Caracterización farmacológica y análisis funcional de los receptores nicotínicos $\alpha 9\alpha 10$ en células cromafines aisladas de la médula adrenal de rata

Luis A. Olivós-Oré, M.<sup>a</sup> Victoria Barahona Gomariz, Diego Bustillo, Jesús Sánchez-Nogueiro, Antonio R. Artalejo\*

Departamento de Toxicología y Farmacología. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

Recibido el 15 de diciembre de 2010.

### RESUMEN

El descubrimiento de receptores nicotínicos (nAChRs) formados por las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  en las células de los epitelios sensitivos del sistema vestibular y auditivo ha motivado su búsqueda en estructuras del sistema nervioso autónomo, como las células cromafines de la médula adrenal, en las que podrían inducir la hiperpolarización de la membrana celular mediante la activación de canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  de baja conductancia iónica (canales SK). El objetivo fundamental de nuestro trabajo ha sido determinar la presencia y, en su caso, caracterizar funcionalmente el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  en las células cromafines de la médula adrenal de la rata. Con ese propósito, hemos empleado cultivos primarios de células cromafines obtenidas de la glándula adrenal de rata y recurrido a la técnica electrofisiológica de *patch-clamp* para registrar las corrientes iónicas generadas por la activación de los nAChRs del conjunto de la membrana celular. Asimismo, hemos empleado la  $\alpha$ -conotoxina RgIA, un péptido capaz de bloquear de forma selectiva los nAChRs formados por las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ . Los resultados obtenidos aportan evidencias farmacológicas que permiten concluir que las células cromafines de la rata expresan nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  funcionales que, además, des-

empeñarían un papel modulador comportamiento eléctrico de dichas células.

**Palabras clave:** Receptor nicotínico; célula cromafín; potencial de membrana; canales SK.

## ABSTRACT

### Pharmacological characterization and functional analysis of $\alpha 9\alpha 10$ acetylcholine nicotinic receptors in isolated chromaffin cells from the rat adrenal medulla

The identification of acetylcholine nicotinic receptors (nAChRs) formed by  $\alpha 9$  and  $\alpha 10$  subunits in the sensory cells of the vestibular and auditory systems, prompted us to investigate their presence in adrenomedullary chromaffin cells, in which they could mediate membrane hyperpolarization through the activation of small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channels (SK channels). The aim of the current study has been to pharmacologically identify  $\alpha 9\alpha 10$  nAChRs and initiate their functional characterization in isolated chromaffin cells from the rat adrenal medulla. We have employed the patch clamp technique to record either the ionic currents generated by the activation of nAChRs or the associated changes in membrane potential. We took advantage of the specificity of  $\alpha$ -conotoxin RgIA for the nAChRs formed by  $\alpha 9$  and  $\alpha 10$  subunits. Our pharmacological results suggest that the rat chromaffin cells express functional  $\alpha 9\alpha 10$  nAChRs that would influence the electrical behaviour of these cells.

**Keywords:** Acetylcholine nicotinic receptor; chromaffin cell; membrane potential; SK channels.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) son canales iónicos activados por ligando —el ligando endógeno es la acetilcolina— formados por la asociación de cinco subunidades con pesos moleculares comprendidos entre 40 y 58 kDa. En la actualidad se

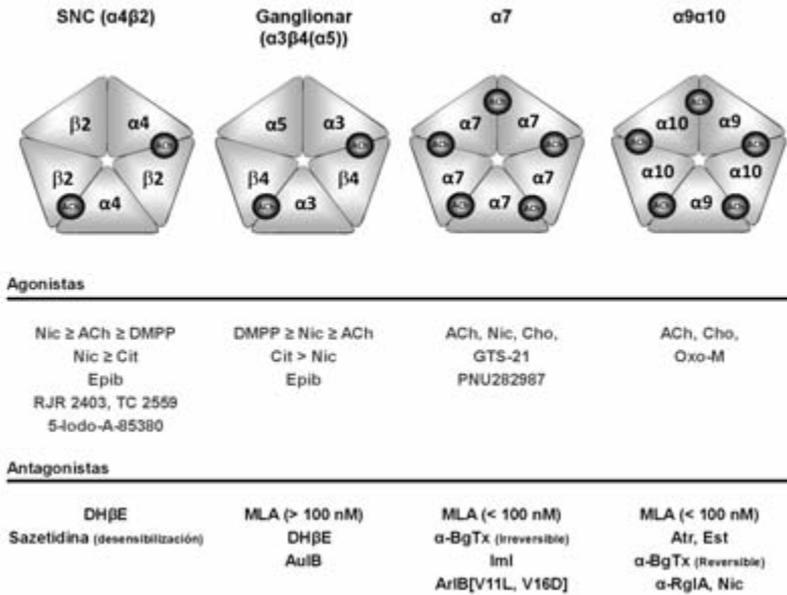
reconoce la existencia de diez subunidades  $\alpha$  diferentes ( $\alpha 1$ - $\alpha 10$ ), cuatro subunidades  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 4$ ), una subunidad  $\gamma$ , una subunidad  $\delta$  y una subunidad  $\epsilon$ .

Los nAChRs pueden clasificarse en tres tipos con propiedades farmacológicas y biofísicas bien diferenciadas y una distribución anatómica característica: el nAChR muscular, localizado en la placa motora, el nAChR neuronal periférico, presente en los ganglios vegetativos y en las células cromafines de la médula adrenal, y el nAChR neuronal central, localizado fundamentalmente en diversas zonas del sistema nervioso central (SNC).

### 1.1. Los receptores nicotínicos neuronales

Desde el punto de vista biofísico los nAChRs neuronales, tanto centrales como periféricos, se distinguen de los nAChRs musculares por presentar una mayor permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  y una marcada rectificación de entrada (1). En los mamíferos se han identificado once subunidades formadoras de nAChRs neuronales:  $\alpha 2$ - $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$  y  $\beta 2$ - $\beta 4$  (2). Las subunidades  $\alpha 7$  y  $\alpha 9$  son capaces de formar homómeros funcionales, mientras que el resto de las subunidades  $\alpha$  da lugar a nAChRs heteroméricos constituidos por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Aunque el número de nAChRs neuronales distintos que puede formarse con la combinación de las once subunidades mencionadas es muy elevado, es posible reconocer algunos nAChRs y con propiedades farmacológicas bien diferenciadas y localizaciones características (Figura 1):  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 4(\beta 2)$ ,  $\alpha 7$  y  $\alpha 9\alpha 10$ . El nAChR  $\alpha 4\beta 2$  es el tipo predominante en el SNC, donde mayoritariamente presenta la estequiometría  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ . Por su parte, el nAChR compuesto por las subunidades  $\alpha 3$  y  $\beta 4$  o  $\beta 2$  se localiza preferentemente en los ganglios vegetativos y en las células cromafines de la médula adrenal. Cuando la subunidad  $\alpha 5$  es incorporada a estos complejos, los nAChRs incrementan su sensibilidad a la acetilcolina y a la nicotina pero no se modifica su respuesta a la epibatidina (3). El nAChR homomérico  $\alpha 7$  se expresa tanto en el SNC como en el periférico, mientras que en diversas estructuras como la cóclea, los ganglios raquídeos, linfocitos, queratinocitos, etc., se han identificado nAChRs formados por las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ . El aislamiento de la  $\alpha$ -conotoxina RgIA ( $\alpha$ -Rg IA) del veneno del caracol

*Conus regius* ha permitido disponer de una herramienta potente y selectiva para bloquear las respuestas mediadas por los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$ , posibilitando el estudio del papel funcional de este nAChR en algunos de los tejidos en los que ha sido identificado.



**Figura 1. Propiedades farmacológicas de los cuatro tipos principales de nAChRs neuronales.** En el panel superior se representa la estequiometría y la localización de los sitios de unión de la acetilcolina en los diferentes pentámeros. ACh: acetilcolina; DMPP: 1,1-dimetil-4-fenil-piperacino; Nic: nicotina; Cit: citisina; Epib: epibatidina; Cho: colina; Oxo-M: oxtremorina-M; DHE: dihidro- $\beta$ -eritroidina; MLA: metilcaconitina; AuIB:  $\alpha$ -conotoxina AuIB; IMI:  $\alpha$ -conotoxina IMI; RgIA:  $\alpha$ -conotoxina RgIA; ArIB [V11L, V16D]:  $\alpha$ -conotoxina ArIB [V11L, V16D];  $\alpha$ -BgTx:  $\alpha$ -bungarotoxina, Atr: atropina; Est: estricnina (Adaptado de 4).

### 1.2. Los receptores nicotínicos $\alpha 9\alpha 10$

Los nAChRs formados por la subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  han sido identificados en el epitelio sensitivo de la cóclea (células ciliadas —*hair cells*— internas y externas) y del laberinto, bulbo olfativo, ganglio del trigémino, ganglios raquídeos, corazón, placenta, linfocitos, queratinocitos, pulmón, adipocitos, espermatozoides, células endoteliales,

músculo liso vascular y músculo esquelético de la lengua (5-8); sin embargo, no han sido hallados en el SNC.

Al ser expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis* las subunidades  $\alpha 9$  pueden combinarse entre sí formando nAChRs homoméricos funcionales, capacidad ésta que no se ha evidenciado para la subunidad  $\alpha 10$  (6, 9). Sin embargo, la coinyección de ARNm de las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  se asocia a la aparición de corrientes de magnitud 1.000 veces superior a las observadas tras la expresión en solitario de la subunidad  $\alpha 9$ , lo que indica que los dos tipos de subunidades se combinan para constituir nAChRs heteroméricos funcionales que presentarían la estequiometría  $(\alpha 9)_2(\alpha 10)_3$ . Esta circunstancia también podría acontecer de manera fisiológica, ya que las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  se colocalizan en la mayoría de las estructuras donde han sido identificadas, considerándose que las subunidades  $\alpha 10$  actuarían como subunidades estructurales (10).

Los nAChRs homoméricos  $\alpha 9$  y los heteroméricos  $\alpha 9 \alpha 10$  presentan una farmacología peculiar entre los nAChRs, ya que, además de ser activados por el agonista muscarínico oxotremorina-M, son los únicos nAChRs inhibidos por la nicotina; asimismo, pueden ser bloqueados por sustancias tan diversas como la muscarina ( $CI_{50(\alpha 9)}$ : 75  $\mu M$ ;  $CI_{50(\alpha 9 \alpha 10)}$ : 41  $\mu M$ ), la estricnina ( $CI_{50(\alpha 9)}$ : 18 nM;  $CI_{50(\alpha 9 \alpha 10)}$ : 20 nM), la bicuculina ( $CI_{50(\alpha 9)}$ : 0,8  $\mu M$ ;  $CI_{50(\alpha 9 \alpha 10)}$ : 1  $\mu M$ ), el tropisetron ( $CI_{50(\alpha 9 \alpha 10)}$ : 70 nM), el ondansetrón ( $CI_{50(\alpha 9 \alpha 10)}$ : 0,6  $\mu M$ ), la atropina ( $CI_{50(\alpha 9 / \alpha 9 \alpha 10)}$ : 1  $\mu M$ ), la  $\alpha$ -bungarotoxina (de forma reversible;  $CI_{50(\alpha 9)}$ : 2,1 nM;  $CI_{50(\alpha 9 \alpha 10)}$ : 14 nM), la metilcaconitina (en el rango nanomolar bajo) (5, 6, 9, 11-13). Los nAChRs  $\alpha 9$  homoméricos y los heteroméricos  $\alpha 9 \alpha 10$  no presentan marcadas diferencias en sus perfiles farmacológicos, excepto una sensibilidad 10 veces superior del nAChR  $\alpha 9 \alpha 10$  al efecto bloqueante de la nicotina ( $CI_{50(\alpha 9)}$ : 31,5  $\mu M$ ;  $CI_{50(\alpha 9 \alpha 10)}$ : 3,9  $\mu M$ ) (6).

Ellison y col. (13, 14) han puesto de manifiesto la extraordinaria potencia y selectividad de la  $\alpha$ -RgIA, un péptido de 13 aminoácidos, para bloquear de forma competitiva las respuestas mediadas por los nAChRs  $\alpha 9 \alpha 10$  de rata, tanto recombinantes —expresados en ovocitos— como los nativos de las células del epitelio sensitivo de la cóclea. Así, la  $CI_{50}$  sobre los nAChRs  $\alpha 9 \alpha 10$  (5 nM) es tres órdenes de magnitud inferior que sobre los nAChRs  $\alpha 7$ . Además, la  $CI_{50}$  de la  $\alpha$ -RgIA sobre los nAChRs  $\alpha 3\beta 2$  y  $\alpha 3\beta 4$  es superior a 10  $\mu M$ .

Los nAChRs  $\alpha 9$  homoméricos y el heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* son altamente permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \sim 9$ ; (15)). Por su parte, Gómez-Casati y col. (16) determinaron que la  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$  del receptor nativo de las células ciliadas de la cóclea de la rata es de 8.

### 1.3. Función del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ en las células ciliadas de la cóclea

El significado funcional de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  ha sido investigado fundamentalmente en las células ciliadas internas y externas de la cóclea de los vertebrados. La activación de estos nAChRs por la acetilcolina liberada por las terminaciones nerviosas de las fibras de la vía olivococlear da lugar a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que a su vez activa los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y pequeña conductancia iónica del tipo 2 (canales SK2; (17)). En este proceso puede participar también la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares mediante el mecanismo de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR; (18)). La apertura de los canales SK2 induce la hiperpolarización de la membrana celular, lo que supone que los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  sean los únicos nAChRs conocidos que ejercen una función inhibitoria de la señalización eléctrica celular.

### 1.4. Las células cromafines de la médula adrenal de la rata

Las células cromafines de la médula adrenal comparten origen embriológico y características morfológicas y funcionales básicas con las neuronas simpáticas postganglionares. A igual que éstas, generan potenciales de acción dependientes de la actividad de canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al potencial de membrana y almacenan catecolaminas, ATP y neuropéptidos en vesículas de secreción denominadas gránulos cromafines. El contenido de los mismos es vertido al torrente sanguíneo en respuesta a la acetilcolina liberada por las terminaciones del nervio esplácnico. Las células cromafines constituyen un modelo ampliamente utilizado en estudios sobre neurotransmisión en virtud de su facilidad de cultivo y capacidad para expresar diversos tipos de receptores nicotínicos; además, la posibi-

lidad de realizar registros electrofisiológicos en rodajas de tejido adrenomedular (19) permite el análisis de la sinapsis esplanco-suprarrenal.

### **1.5. Los receptores nicotínicos de las células cromafines de la médula adrenal**

Existen evidencias de que en las células cromafines de la rata y del hombre podrían expresarse nAChRs formados por las subunidades  $\alpha 2$  (no en el hombre),  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 4$  (20, 21), mientras que en las células bovinas las subunidades constituyentes de los nAChRs serían la  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$  y  $\beta 4$  (22, 23).

En la actualidad se considera que el nAChR mayoritario de las células cromafines es el de tipo ganglionar, formado por las subunidades  $\alpha 3$  y  $\beta 4$ , a las que también podrían asociarse, para constituir heterómeros más complejos, las subunidades  $\alpha 5$  y/o  $\beta 2$  (21, 24-26).

### **1.6. Los receptores nicotínicos y el potencial de membrana de la célula cromafín**

La activación de los nAChRs induce cambios en el potencial de membrana así como modificaciones —tanto de forma directa como indirecta— en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (27). La acetilcolina liberada por las terminaciones del nervio esplácnico activa nAChRs y receptores muscarínicos de la membrana de las células cromafines. Clásicamente, se viene aceptando que la acetilcolina origina una respuesta despolarizante rápida dependiente de la activación de los nAChRs, con el consiguiente disparo de potenciales de acción, seguida de una fase de hiperpolarización relacionada con el aumento de la conductancia de  $\text{K}^+$  activada por el incremento citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  y dependiente tanto de la movilización de los depósitos intracelulares de este catión por la estimulación muscarínica como de su entrada a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (CCDV) activados durante la fase de despolarización (28). El hallazgo en las células cromafines de nAChRs con alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\alpha 7$  y  $\alpha 9\alpha 10$ ) (29) ha añadido complejidad al mecanismo de señalización nicotínica al

posibilitar un efecto dual rápido —despolarizante e hiperpolarizante— sobre el potencial de membrana. La activación de los nAChRs induce un aumento de la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  en la que participan distintos mecanismos: i) entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del nAChR; ii) entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de CCDV, y iii) movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares. La señal citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por los nAChRs de tipo ganglionar ( $\alpha 3\beta 4$ ) es dependiente fundamentalmente de la despolarización y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de CCDV; sin embargo, los nAChRs de tipo  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  posibilitarían la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  directamente a su través —independientemente de la activación de los CCDV— la cual, además, podría activar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares tanto sensibles a rianodina —mecanismo de tipo CICR— como sensibles a inositol trisfosfato (27).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este trabajo se han utilizado cultivos primarios (2 a 4 días) de células cromafines de la médula adrenal de ratas Sprague Dawley macho, con edades comprendidas entre seis y ocho semanas (200-300 g) y procedentes del Animalario de la Universidad Complutense de Madrid (Número de Registro 28079-15ABC de la Dirección General de Agricultura y Alimentación de la Comunidad Autónoma de Madrid).

Los registros electrofisiológicos —de corriente y potencial de membrana— realizados para la caracterización farmacológica y funcional de las corrientes nicotínicas se obtuvieron mediante el empleo de la configuración de célula completa de la técnica de *patch-clamp* en las modalidades de fijación de voltaje ( $V_h = -70$  mV) y fijación de corriente ( $V_m \sim -60$  mV) con el concurso de un amplificador EPC9 controlado con el programa Pulse 9.7 (HEKA Elektronik, Alemania). Asimismo, en la modalidad de fijación de voltaje se monitorizó de forma continua la capacitancia de la membrana celular y las resistencias en serie, que nunca excedieron los 20 M $\Omega$ .

Las corrientes nicotínicas así como los registros de potencial de membrana fueron filtrados a 2 KHz y digitalizadas a 4 KHz para su posterior análisis y representación gráfica con el programa Igor Pro 5.05 (WaveMetrics, EEUU).

Las soluciones de registro variaron dependiendo del tipo de experimento. Así, la solución interna empleada en los experimentos de caracterización farmacológica de los nAChRs tuvo la siguiente composición (mM): glutamato de  $\text{Cs}^+$  145, NaCl 8, HEPES 10, EGTA 10,  $\text{MgCl}_2$  1, ATP. $\text{Na}_2$  2, GTP. $\text{Li}_2$  0,3 (pH ajustado a 7,2 con CsOH); en los experimentos en los que se llevaron a cabo registros del potencial de membrana, las micropipetas fueron rellenas con la siguiente solución (mM): glutamato de  $\text{K}^+$  145, KCl 10, HEPES 10,  $\text{MgCl}_2$  2, EGTA 0,1, ATP. $\text{Na}_2$  2 y GTP 0,3, (pH ajustado a 7,2 con KOH). En todos los casos la solución externa con la que se superfundieron las células durante los experimentos ( $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , a temperatura ambiente) estuvo compuesta por (mM): NaCl 145, KCl 2,8,  $\text{CaCl}_2$  1,  $\text{MgCl}_2$  1, HEPES 10, glucosa 10 (pH ajustado a 7,4 con HCl o NaOH).

La administración de fármacos se realizó directamente sobre la célula en estudio mediante un sistema de perfusión por gravedad (Figura 2A) que constaba de cinco vías dotadas de electroválvulas controladas con el programa PULSE 9.7. La salida del sistema se colocó aproximadamente a  $100 \mu\text{m}$  de la célula de forma que el recambio de la solución que rodea a la célula se produjera en  $\sim 30 \text{ ms}$  (Figura 2B).

La estimulación con los fármacos agonistas se realizó mediante pulsos breves (100 – 1000 ms) administrados tres veces consecutivas a intervalos de 45 s, calculándose posteriormente la media de las respuestas (pulsos 1°, 2° y 3°). El efecto de los fármacos antagonistas se evaluó también por triplicado en cada experimento, perfundiéndose en el baño durante 45 s antes de ser coaplicados localmente con el agonista (pulsos 4°, 5° y 6°). Finalmente, el agonista fue administrado tres veces más durante el período de lavado del antagonista con objeto de estudiar la reversibilidad del efecto de este último (pulsos 7°, 8° y 9°) (Figura 2C).

En la elaboración de curvas concentración-respuesta, las corrientes obtenidas en presencia de las diferentes concentraciones de antagonista fueron normalizadas respecto a la corriente control registrada en ausencia del mismo. Tanto las representaciones de barras como el ajuste de las curvas concentración-respuesta se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism V. 4.03 (GraphPad Software Inc., EEUU).

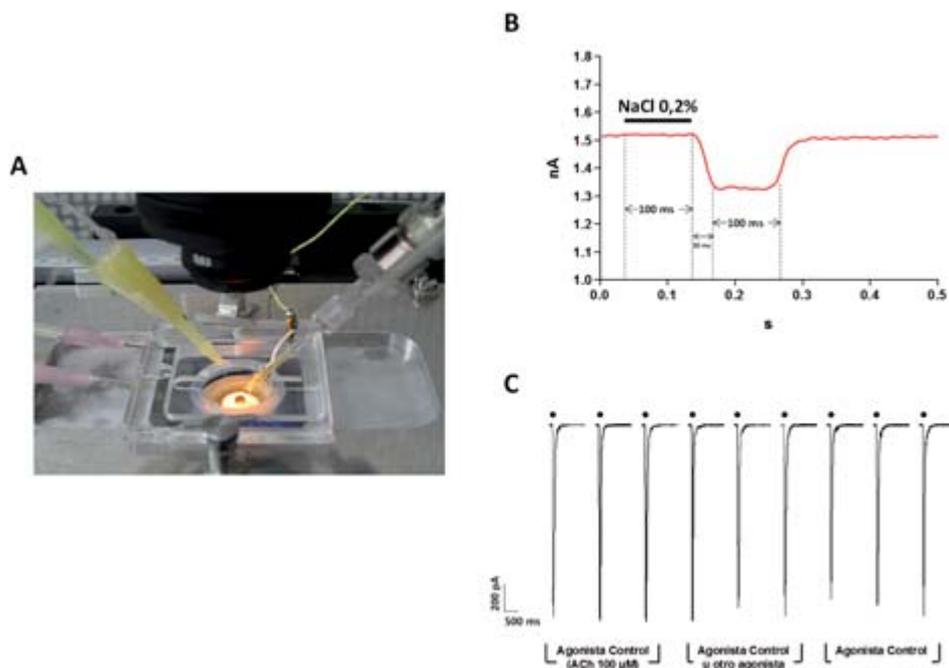
Los resultados aparecen expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM) para un determinado número (n) de experimentos. La comparación entre las medias correspondientes a distintos grupos de experimentos se realizó mediante el test de la *t* de Student. En todos los casos los niveles de significación establecidos fueron  $P < 0,001$  (\*\*\*) ;  $P < 0,01$  (\*\*) ó  $P < 0,05$  (\*). Los valores de *P* superiores a 0,05 se han considerado como no significativos (ns).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Reproducibilidad de las corrientes inducidas por acetilcolina en las células cromafines de la rata

La estimulación repetida o prolongada de los nAChRs ocasiona su desensibilización, en la que intervendrían factores como el tipo de receptor, la concentración y el tipo de agonista, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y diversas proteínas cinasas y fosfatasas intracelulares.

Con la finalidad de minimizar la desensibilización de los nAChRs empleamos un sistema de administración de fármacos y soluciones salinas diseñado en nuestro laboratorio, que constaba de cinco tubos de polietileno de 250  $\mu\text{m}$  de diámetro con una salida común (Figura 2A). Además, el flujo a través de cada uno de los tubos estaba regulado por electroválvulas, lo que permite realizar aplicaciones de fármacos durante tiempos muy cortos. En la Figura 2B, se muestra la corriente que fluye a través de una micropipeta de *patch-clamp* rellena con una solución salina fisiológica (NaCl al 0,9%) y bañada por una solución externa de idéntica composición cuando el  $V_h$  es de 2 mV. La administración local de un pulso de 100 ms de una solución salina diluida (NaCl al 0,2%) determina un cambio —reducción— de la corriente que se produce con una latencia de 100 ms respecto al comienzo de la aplicación y tarda 30 ms en completarse (tiempo de recambio). Como se muestra en la Figura 2C, la administración con este dispositivo de pulsos de acetilcolina (100  $\mu\text{M}$ ) de 100 ms de duración a intervalos de 45 s dio lugar a respuestas de corriente con magnitudes muy reproducibles.



**Figura 2. Sistema de administración de fármacos y reproducibilidad de las corrientes inducidas por acetilcolina (ACh).** **A.** Dispositivo de aplicación local de fármacos. **B.** Características cinéticas del sistema de aplicación de fármacos. **C.** Respuestas de corriente inducidas por la aplicación de nueve pulsos consecutivos de ACh.

### 3.2. Caracterización farmacológica de los receptores nicotínicos de la célula cromafín de la rata

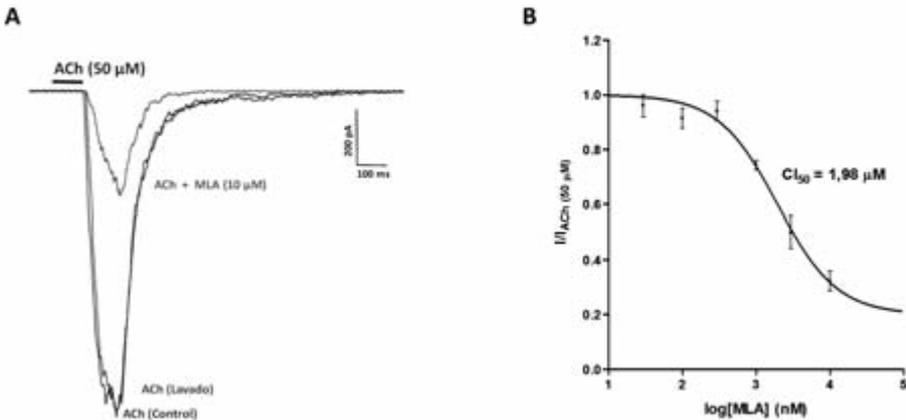
Estudios farmacológicos previos de nuestro grupo realizados en células cromafines de rata han permitido estimar la  $CE_{50}$  de la acetilcolina ( $63 \mu\text{M}$ ), la nicotina ( $24 \mu\text{M}$ ), la oxotremorina-M ( $507 \mu\text{M}$ ) y la colina ( $2393 \mu\text{M}$ ) para activar las corrientes nicotínicas. Estos resultados además de poner de manifiesto la heterogeneidad de los nAChRs funcionales presentes en las células cromafines de la rata sugerían también la presencia en dichas células de nAChRs de los tipos  $\alpha 7$  y/o  $\alpha 9\alpha 10$ .

Esta interpretación se vio reforzada mediante el empleo de metilicaconitina, un antagonista de los nAChRs formados por las subuni-

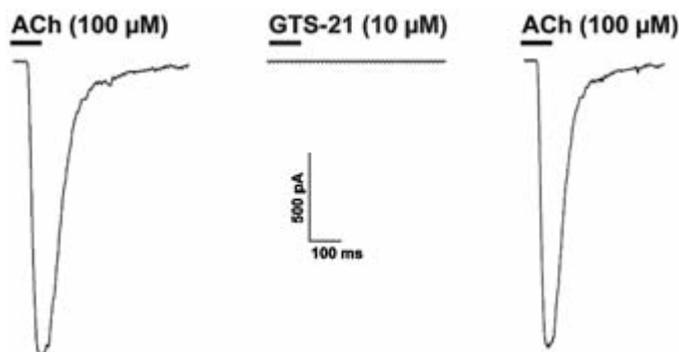
dades  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ , que inhibió reversiblemente las corrientes ( $CI_{50}$  de  $1,98 \mu M$ ) inducidas por acetilcolina ( $50 \mu M$ ), (Figura 3).

Dado que la metilicaconitina ejerce sus efectos indistintamente sobre nAChRs  $\alpha 7$  y  $\alpha 9\alpha 10$  (30), decidimos investigar la presencia de los nAChRs  $\alpha 7$  en las células cromafines de la rata recurriendo al empleo de un agonista selectivo de los mismos, el GTS-21 (31). La administración de GTS-21 a la concentración de  $10 \mu M$ , que produce una activación máxima de los nAChRs  $\alpha 7$  en neuronas del hipocampo de rata (32), indujo una respuesta de corriente en sólo el 12% de las células estudiadas ( $n = 34$ ), cuya magnitud, además, fue inferior al 1% de la observada tras la administración de acetilcolina ( $100 \mu M$ ) (Figura 4).

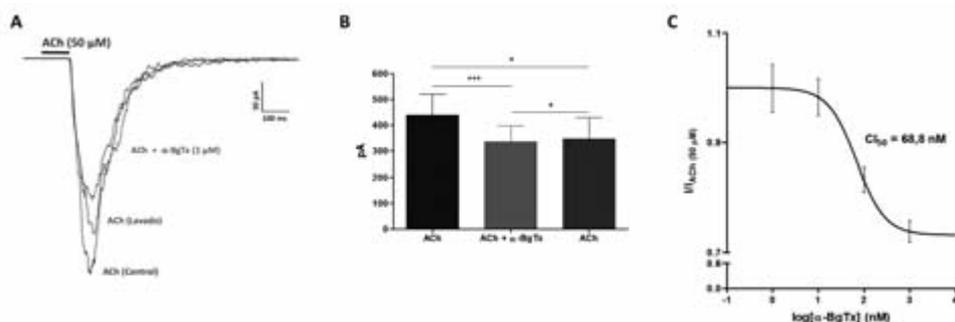
Una segunda estrategia farmacológica que cabe emplear para diferenciar los componentes de la respuesta dependientes de la activación de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  y de los nAChRs  $\alpha 7$  se basa en el uso de la  $\alpha$ -bungarotoxina, una toxina que se une de forma reversible a los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  (9) e irreversible a los nAChRs  $\alpha 7$  homoméricos (33). La  $\alpha$ -bungarotoxina ( $1 \mu M$ ) inhibió de forma parcialmente reversible (Figura 5A y B) las corrientes inducidas por acetilcolina ( $50 \mu M$ ) con una  $CI_{50}$  de  $68,8 \text{ nM}$  y un efecto máximo del 30% (Figura 5C).



**Figura 3. Efecto de metilicaconitina (MLA) sobre las corrientes inducidas por acetilcolina (ACh) en las células cromafines de la rata. A.** Registros de corrientes representativos del bloqueo reversible observado con MLA. **B.** Curva concentración-respuesta para MLA ( $n = 4-7$  células).



**Figura 4.** Efecto de GTS-21 sobre las células cromafines de la rata. Registro de las corrientes obtenidas tras la administración consecutiva de acetilcolina (ACh) y GTS-21 a intervalos de 45 s en la misma célula.

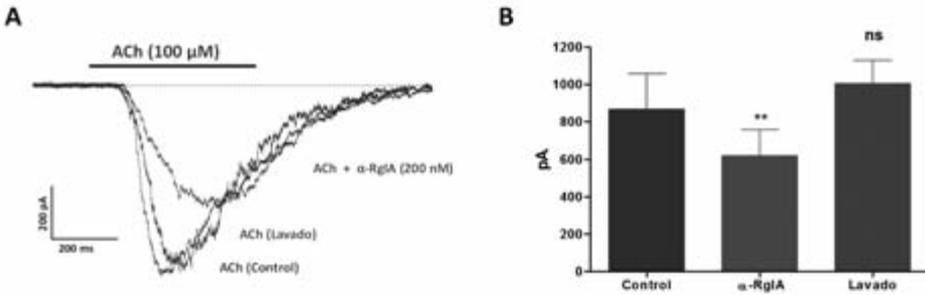


**Figura 5.** Efecto de  $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ -BgTx) sobre las corrientes inducidas por acetilcolina (ACh). **A.** Registros representativos del efecto bloqueante de  $\alpha$ -BgTx y de su reversibilidad. **B.** Reversibilidad del efecto bloqueante de  $\alpha$ -BgTx sobre las respuestas inducidas por ACh. **C.** Curva concentración-respuesta para  $\alpha$ -BgTx ( $n = 5-14$  células). \*\*\* $P < 0,001$ ; \* $P < 0,05$ .

### 3.3. Identificación farmacológica del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ de la célula cromafín de la rata

Los resultados obtenidos con metilcaconitina, GTS-21 y  $\alpha$ -bungarotoxina sugerían que en las células cromafines de la rata se ex-

presan los nAChRs  $\alpha 7$  y  $\alpha 9\alpha 10$ , si bien constituirían una pequeña fracción del conjunto de los nAChRs que pueden ser activados por la acetilcolina. Al objeto de llevar a cabo una adecuada caracterización farmacológica y funcional de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  resulta conveniente trabajar con un fármaco antagonista que presente una elevada selectividad por los mismos. Por ello, recurrimos a la  $\alpha$ -RgIA. A la concentración de 200 nM, la  $\alpha$ -RgIA produjo un bloqueo del 30% sobre las corrientes inducidas por acetilcolina (100  $\mu$ M) tras un período de incubación de 4 minutos. Es de destacar también que el efecto bloqueante de esta toxina fue completamente reversible en el minuto siguiente a la retirada de la misma (Figura 6).



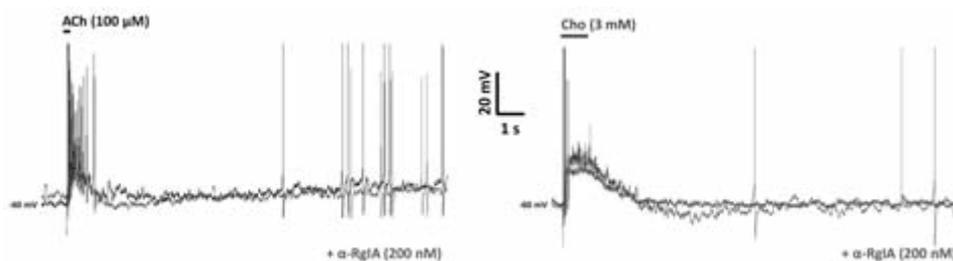
**Figura 6. Efecto de  $\alpha$ -conotoxina RgIA ( $\alpha$ -RgIA) sobre las corrientes nicotínicas. A.** Registro representativo del efecto bloqueante de la  $\alpha$ -RgIA. **B.** Diagramas de barras representativo de la reversibilidad del efecto de la  $\alpha$ -RgIA (n = 5-40 células). \*\*P < 0,01; ns: no significativo, respecto al control.

### 3.4. Participación del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ en el control del potencial de membrana de las células cromafines

Aunque los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  constituyen una población minoritaria —la corriente inducida por acetilcolina es bloqueada en un 30% por la  $\alpha$ -conotoxina RgIA— entre los nAChRs de la célula cromafín de la rata, su elevada permeabilidad al  $Ca^{2+}$  sugiere que podrían desempeñar un papel singular en la regulación de la actividad eléctrica de la membrana plasmática a través de la activación de conductancias de

$K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ . Estas conductancias de  $K^+$ , cuya presencia y propiedades han sido bien caracterizadas en las células cromafines (34, 35), son capaces de activarse en respuesta a la elevación de la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  favoreciendo la salida de  $K^+$  y, en consecuencia, un cambio —en sentido hiperpolarizante— del potencial de membrana. Los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  de pequeña conductancia iónica (canales SK) destacan entre este tipo de canales por su elevada sensibilidad al  $Ca^{2+}$  al potencial de reposo de la célula, lo que les permite contribuir a la posthiperpolarización de los potenciales de acción o ser responsables de la hiperpolarización que sigue a la activación de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  en las células del epitelio sensitivo de la cóclea (6, 17).

Para analizar la contribución de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  en la actividad eléctrica de las células cromafines de la rata se han valorado los efectos de la  $\alpha$ -RgIA (200 nM) sobre la respuesta de potencial inducida por la acetilcolina (100  $\mu$ M; 250 ms) y la colina (3 mM, 1 s). Esta toxina modificó de forma variable el perfil de la fase despolarizante de la respuesta, produciendo una reducción en la amplitud de la misma que resultó más notoria en el caso de la colina, probablemente por la mayor selectividad de este fármaco para activar los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$ . Asimismo, la  $\alpha$ -conotoxina RgIA bloqueó la hiperpolarización que sigue a la administración de colina y acortó la duración de la descarga de potenciales de acción inducida por la aplicación de acetilcolina (Figura 7).



**Figura 7.** Efecto de  $\alpha$ -conotoxina RgIA ( $\alpha$ -RgIA; 200 nM, 4 min) sobre los cambios del potencial de membrana inducidos por la administración de acetilcolina (ACh) o colina (Cho) en células cromafines de rata.

## 4. DISCUSIÓN

El presente trabajo se encuadra en una línea de investigación sobre la farmacología de los nAChRs neuronales que, en última instancia, aspira al desarrollo de fármacos selectivos para los distintos tipos de nAChRs y potencialmente útiles para el tratamiento de diversas entidades nosológicas (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, dolor, adicción tabáquica, etc.) con elevada prevalencia en las sociedades desarrolladas. Más concretamente, nuestro trabajo se suma al de otros laboratorios interesados en la caracterización molecular, farmacológica, biofísica e indagación del significado funcional de los nAChRs presentes en las células cromafines de la médula adrenal de los mamíferos. Las células cromafines constituyen un modelo ampliamente utilizado para el estudio de los nAChRs neuronales, dada la diversidad de los que expresan (20-22), y para la investigación de su relevancia fisiológica e implicaciones fisiopatológicas a tenor de las ventajas que ofrecen para el estudio de la respuesta neurosecretora (36) y de los mecanismos de la neuroprotección (37). En este trabajo se ha puesto énfasis en dos aspectos relacionados con los nAChRs: i) la caracterización farmacológica de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  de las células cromafines de la rata; ii) el estudio de su significado funcional.

### 4.1. Caracterización farmacológica del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ de las células cromafines de la rata

La caracterización de los nAChRs formados por las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  se ha visto favorecida por la peculiar farmacología de los mismos, que les lleva a compartir propiedades tanto con los nAChRs como con los muscarínicos. Así, agonistas nicotínicos típicos, como el dimetil-fenil-piperacinio y la colina, o el clásico agonista muscarínico oxotremorina-M se comportan como agonistas parciales de estos receptores. Análogamente, diversos antagonistas tanto nicotínicos (d-tubocurarina, metilcaconitina o la  $\alpha$ -bungarotoxina) como muscarínicos (atropina) son capaces de inhibir las respuestas mediadas por los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  (5, 6, 11, 12, 38).

El hecho de que diversos fármacos agonistas con diferente selectividad por los distintos tipos de nAChRs (acetilcolina, nicotina, colina,

oxotremorina-M) induzcan respuestas con potencias y magnitudes máximas notablemente dispares, resulta indicativo de la heterogeneidad de los nAChRs expresados por las células cromafines de la rata. Esta heterogeneidad de nAChRs, quedó confirmada por los resultados obtenidos con metilicacnitina, un antagonista de los nAChRs formados por las subunidades  $\alpha 7$  o  $\alpha 9\alpha 10$  a concentraciones inferiores a 100 nM, y de los constituidos por las subunidades  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$  a concentraciones superiores a la referida.

Nuestros resultados son congruentes con los publicados por otros cuatro grupos de investigación (20, 21, 24, 25, 39) que, basándose en evidencias tanto de tipo funcional como molecular han propuesto que los nAChRs predominantes en las células cromafines de la rata serían los de tipo ganglionar ( $\alpha 3\beta 4(\alpha 5)$  y  $\alpha 3\beta 2(\alpha 5)$ ) y el  $\alpha 7$ . Debemos señalar que los resultados funcionales que sugieren la expresión de nAChRs  $\alpha 7$  en las células cromafines de rata se han basado casi exclusivamente en la utilización de  $\alpha$ -bungarotoxina, una toxina que bloquea con elevada potencia tanto los nAChRs  $\alpha 7$  ( $CI_{50}$  de 1,9 nM; (38)) como los formados por las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  ( $CI_{50}$  de 6-64 nM; (5, 6, 9, 38)). Existe, no obstante, una particularidad del efecto bloqueante de esta toxina que puede ser de utilidad para identificar la diana sobre la que actúa: la  $\alpha$ -bungarotoxina se combina con el nAChR  $\alpha 7$  de manera esencialmente irreversible (40) mientras que su efecto sobre los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  es característicamente revertido en pocos minutos de lavado (5, 6, 9).

La  $\alpha$ -bungarotoxina bloqueó parcialmente (~ 30%) y con una  $CI_{50}$  de 68,8 nM las corrientes inducidas por acetilcolina en las células cromafines de la rata. Además, el efecto bloqueante fue parcialmente reversible. Por otro lado, el hecho de que el GTS-21, un agonista selectivo de los nAChRs  $\alpha 7$  (31), fuera ineficaz para inducir una respuesta de corriente en la práctica totalidad de las células estudiadas, permite descartar a los nAChRs  $\alpha 7$  como la principal diana de la acción de la metilicacnitina o de la  $\alpha$ -bungarotoxina en nuestra preparación.

La evidencia farmacológica definitiva de la presencia de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  en las células cromafines de rata se obtuvo mediante el empleo de la  $\alpha$ -RgIA, una toxina que presenta una elevada potencia ( $CI_{50}$  ~ 5 nM) para bloquear los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  de la rata tanto na-

tivos (células ciliadas internas de la cóclea) como expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*. Conviene señalar también la extraordinaria selectividad de esta toxina respecto a los nAChRs  $\alpha 7$  ( $CI_{50}$  de 4,6  $\mu M$ ), lo y los nAChRs ganglionares ( $\alpha 3\beta 2$  o  $\alpha 3\beta 4$ ;  $CI_{50} > 10 \mu M$ ), lo que la convierte en una herramienta mucho más adecuada que la metilicacónitina y la  $\alpha$ -bungarotoxina (no discriminan entre los nAChRs  $\alpha 7$  y nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$ ) o la  $\alpha$ -conotoxina PeIA (no distingue entre los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  — $CI_{50}$  de 6,9 nM— y los nAChRs  $\alpha 3\beta 2$  — $CI_{50}$  de 23 nM; (41), para identificar los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  en tejidos como la médula adrenal en los que se expresan las anteriores tres clases de nAChRs. La administración de dosis supramáximas de  $\alpha$ -conotoxina RgIA (200 nM) se asoció con un porcentaje de bloqueo del 30% de las corrientes inducidas por acetilcolina. Además, los efectos de esta toxina fueron completamente reversibles tras un periodo de lavado de un minuto, en consonancia con lo descrito sobre los efectos de la  $\alpha$ -RgIA sobre los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  en otras localizaciones (13, 14). En definitiva, el conjunto de las evidencias farmacológicas presentadas permite concluir que las células cromafines de la rata expresan nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  funcionales.

#### **4.2. Contribución de los receptores nicotínicos $\alpha 9\alpha 10$ a los cambios de potencial de membrana inducidos por la estimulación colinérgica de las células cromafines**

Las células ciliadas externas del epitelio sensitivo de la cóclea de los mamíferos (rata, ratón, cobaya, etc.) reciben aferencias colinérgicas inhibitorias dependientes de la activación de nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$ . La apertura del ionóforo asociado al nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  posibilita no solo la entrada de  $Na^+$  sino también de  $Ca^{2+}$  a la célula y, subsiguientemente, la aparición de una corriente de salida de  $K^+$  a través de los canales SK. Ello determina que la respuesta eléctrica a la estimulación nicotínica sea bifásica, con una breve despolarización seguida de una hiperpolarización rápida y duradera (17).

En las células cromafines de la médula adrenal de la rata, la estimulación de los nAChRs por la acetilcolina induce una despolarización de la membrana celular con el consiguiente disparo de potenciales de acción y entrada de  $Ca^{2+}$  a través de CCDV, que se añadiría al

que pudiera entrar a través de los nAChRs (42). Cabe destacar también que las células cromafines están dotadas de receptores muscarínicos (28) y canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  de los tipos SK y BK (43). Los canales SK de las células cromafines, además de mediar respuestas hiperpolarizantes dependientes de la movilización de  $Ca^{2+}$  desde depósitos intracelulares, pueden también determinar la frecuencia de disparo de potenciales de acción durante una despolarización prolongada. Ello es así porque los canales SK son responsables de la posthiperpolarización lenta (*slow afterhyperpolarization*) que se observa en muy diversos tipos neuronales que descargan potenciales de acción dependientes de la entrada de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  (44, 45). Durante un tren de potenciales de acción de este tipo se produce la acumulación de  $Ca^{2+}$  en la vecindad de la membrana celular, lo que conduce a la activación progresiva de los canales SK y, consiguientemente, al aumento de la amplitud y duración de las posthiperpolarizaciones lentas. Ello determina un incremento paulatino del intervalo entre los potenciales de acción y, eventualmente, la abolición del disparo de los mismos (*frequency adaptation*). Por su parte, los canales BK de las células cromafines han sido implicados en la repolarización de los potenciales de acción y en la posthiperpolarización rápida (*fast afterhyperpolarization*) de los mismos.

En los experimentos encaminados a analizar la respuesta de voltaje a la estimulación nicotínica, se emplearon dos fármacos colinérgicos, la acetilcolina y la colina. En virtud de la farmacología de estos dos agentes, se puede concluir que la respuesta despolarizante observada con acetilcolina y colina se debe a la entrada de cationes ( $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ ) a través de los nAChRs; por otra parte, la respuesta hiperpolarizante obtenida tras la administración de colina puede ser atribuida a la apertura de canales SK como consecuencia de la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de CCDV, activados durante la fase de despolarización, y/o de los nAChRs. El hecho de que la respuesta hiperpolarizante sea suprimida por la  $\alpha$ -RgIA unido al escaso efecto de esta toxina sobre la descarga de potenciales de acción, permitiría atribuirla a la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$ . Por otra parte, los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  también estarían involucrados en el control de la frecuencia y duración de la descarga de potenciales de acción que ocurre durante la despolarización inducida por acetilcolina. A diferencia de la colina, que activaría predominantemente los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$ , el

agonista endógeno reclutaría la totalidad de los nAChRs de la célula cromafín. En consecuencia, la  $\alpha$ -conotoxina RgIA apenas modificaría la respuesta despolarizante inducida por la acetilcolina dependiente de la activación de nAChRs fundamentalmente de tipo ganglionar, aunque sí modificaría el patrón de descarga de potenciales de acción en razón a la particular capacidad de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  para posibilitar la entrada de  $Ca^{2+}$  y, consiguientemente, contribuir a la posthiperpolarización asociada a la activación de los canales SK.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido desarrollado en el marco de los Proyectos de Investigación BFI2002-01093 del Ministerio de Ciencia y Tecnología, BFU2005-06034BFI del Ministerio de Educación y Ciencia de España, y S-SAL 0253 2006 de la Comunidad Autónoma de Madrid. Asimismo, agradecemos al Profesor William Kem de la Universidad de Florida, la donación del GTS-21, y al Profesor Michael McIntosh de la Universidad de Utah, el habernos facilitado la  $\alpha$ -conotoxina RgIA.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Castro, N. G. & Albuquerque, E. X. (1995).  $\alpha$ -Bungarotoxin-sensitive hippocampal nicotinic receptor channel has a high calcium permeability. *Biophysical Journal*. 68(2): 516-24.
2. Gotti, C., Zoli, M. & Clementi, F. (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends in Pharmacological Sciences*. 27(9): 482-91.
3. Wang, F., Gerzanich, V., Wells, G. B., Anand, R., Peng, X., Keyser, K. & Lindstrom, J. (1996). Assembly of human neuronal nicotinic receptor  $\alpha 5$  subunits with  $\alpha 3$ ,  $\beta 2$  and  $\beta 4$  subunits. *Journal of Biological Chemistry*. 271(30): 17656-65.
4. Wonnacott, S. & Barik, J. (2007). Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Tocris Co-oxson Publication*. 28: 1-20.
5. Elgoyhen, A. B., Johnson, D. S., Boulter, J., Vetter, D. E. & Heinemann, S. (1994)  $\alpha 9$ : an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Neuron*. 79: 705-15.
6. Elgoyhen, A. B., Vetter, D. E., Katz, E., Rothlin, C. V., Heinemann, S. & Boulter, J. (2001)  $\alpha 10$ : A determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory cells. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. 98: 3501-6.

7. Kumar, P. & Meizel, S. (2005). Nicotinic acetylcholine receptor subunits and associated proteins in human sperm. *Journal of Biological Chemistry*. 280(27): 25928-35.
8. Biallas, S., Wilker, S., Lips, K. S., Kummer, W., Grando, S. A., Padberg, W. & Grau, V. (2007). Immunohistochemical detection of nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha9 and alpha10 in rat lung isografts and allografts. *Life Sciences*. 80(24-25): 2286-9.
9. Sgard, F., Charpantier, E., Bertrand, S., Walker, N., Caput, D., Graham, D., et al. (2002). A novel human nicotinic receptor subunit, alpha10, that confers functionality to the alpha9-subunit. *Molecular Pharmacology*. 61: 150-9.
10. Plazas, P. V., Katz, E., Gomez-Casati, M. E., Bouzat, C. & Elgoyhen, A. B. (2005). Stoichiometry of the alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptor. *Journal of Neurosciences*. 25(47): 10905-12.
11. Verbitsky, M., Rothlin, C. V., Katz, E. & Elgoyhen, A. B. (2000). Mixed nicotinic-muscarinic properties of the alpha9 nicotinic cholinergic receptor. *Neuropharmacology*. 39(13): 2515-24.
12. Rothlin, C. V., Lioudyno, M. I., Silbering, A. F., Plazas, P. V., Casati, M. E., Katz, E., Guth, P. S. & Elgoyhen, A. B. (2003). Direct interaction of serotonin type 3 receptor ligands with recombinant and native alpha 9 alpha 10-containing nicotinic cholinergic receptors. *Molecular Pharmacology*. 63(5): 1067-74.
13. Ellison, M., Haberlandt, C., Gomez-Casati, M. E., Watkins, M., Elgoyhen, A. B., McIntosh, J. M. & Olivera, B. M. (2006). Alpha-RgIA: a novel conotoxin that specifically and potently blocks the alpha9alpha10 nAChR. *Biochemistry*. 45(5): 1511-7.
14. Ellison, M., Feng, Z. P., Park, A. J., Zhang, X., Olivera, B. M., McIntosh, J. M. & Norton, R. S. (2008). Alpha-RgIA, a novel conotoxin that blocks the alpha9alpha10 nAChR: structure and identification of key receptor-binding residues. *Journal of Molecular Biology*. 377(4): 1216-27.
15. Katz, E., Verbitsky, M., Rothlin, C. V., Vetter, D. E., Heinemann, S. F. & Elgoyhen, A. B. (2000). High calcium permeability and calcium block of the alpha9 nicotinic acetylcholine receptor. *Hear Research*. 141(1-2): 117-28.
16. Gomez-Casati, M. E., Fuchs, P. A., Elgoyhen, A. B. & Katz, E. (2005). Biophysical and pharmacological characterization of nicotinic cholinergic receptors in rat cochlear inner hair cells. *Journal of Physiology*. 566(Pt 1): 103-108.
17. Blanchet, C., ErosteGUI, C., Sugasawa, M. & Dulon, D. (1996). Acetylcholine-induced potassium current of guinea pig outer hair cells: its dependence on a calcium influx through nicotinic-like receptors. *Journal of Neurosciences*. 16(8): 2574-84.
18. Lioudyno, M., Hiel, H., Kong, J. H., Katz, E., Waldman, E., Parameshwaran-Iyer, S., Glowatzki, E. & Fuchs, P. A. (2004). A "synaptoplasmic cistern" mediates rapid inhibition of cochlear hair cells. *Journal of Neurosciences*. 24(49): 11160-4.
19. Moser, T. (1998). Low-conductance intercellular coupling between mouse chromaffin cells in situ. *Journal of Physiology*. 506 (Pt 1): 195-205.
20. Mousavi, M., Hellstrom-Lindahl, E., Guan, Z. Z., Bednar, I. & Nordberg, A. (2001). Expression of nicotinic acetylcholine receptors in human and rat adrenal medulla. *Life Sciences*. 70: 577-90.

21. Di Angelantonio, S., Matteoni, C., Fabbretti, E. & Nistri, A. (2003). Molecular biology and electrophysiology of neuronal nicotinic receptors of rat chromaffin cells. *European Journal of Neurosciences*. 17(11): 2313-22.
22. Criado, M., Dominguez del Toro, E., Carrasco-Serrano, C., Smillie, F. I., Juiz, J. M., Viniestra, S. & Ballesta, J. J. (1997). Differential expression of alpha-bungarotoxin-sensitive neuronal nicotinic receptors in adrenergic chromaffin cells: a role for transcription factor Egr-1. *Journal of Neurosciences*. 17(17): 6554-64.
23. Campos-Caro, A., Smillie, F. I., Domínguez del Toro, E., Rovira J. C., Vicente-Agullo, F., Chapuli, J., *et al.* (1997). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors on bovine chromaffin cells: cloning, expression, and genomic organization of receptor subunits. *Journal of Neurochemistry*. 68: 488-97.
24. Martín, A. O., Mathieu, M-N. & Guérineau, N. C. (2003). Evidence for long-lasting cholinergic control of gap junctional communication between adrenal chromaffin cells. *Journal of Neurosciences*. 23: 3669-3678.
25. Martín, A. O., Alonso, G. & Guérineau, N. C. (2005). Agrin mediates a rapid switch from electrical coupling to chemical neurotransmission during synaptogenesis. *Journal of Cell Biology*. 169(3): 503-14.
26. Free, R. B., McKay, S. B., Gottlieb, P. D., Boyd, T. & McKay, D. B. (2005) Expression of Native  $\alpha 3\beta 4^*$  Neuronal Nicotinic Receptors: Binding and Functional Studies Investigating Turnover of Surface and Intracellular Receptor Populations. *Molecular Pharmacology*. 67: 2040-48.
27. Dajas-Bailador, F. & Wonnacott, S. (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends in Pharmacological Sciences*. 25(6): 317-24.
28. Olivos, L. & Artalejo, A. R. (2008). Muscarinic excitation-secretion coupling in chromaffin cells. *Acta Physiologica (Oxf)*. 192(2): 213-20.
29. Fucile, S., Sucapane, A. & Eusebi, F. (2006)  $Ca^{2+}$  permeability through rat cloned alpha9-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium*. 39(4): 349-55.
30. Pereira, E. F., Hilmas, C., Santos, M. D., Alkondon, M., Maelicke, A. & Albuquerque, E. X. (2002). Unconventional ligands and modulators of nicotinic receptors. *Journal of Neurobiology*. 53(4): 479-500.
31. Stokes, C., Papke, J. K., Horenstein, N. A., Kem, W. R., McCormack, T. J. & Papke, R. L. (2004). The structural basis for GTS-21 selectivity between human and rat nicotinic alpha7 receptors. *Molecular Pharmacology*. 66(1): 14-24.
32. Séguela, P., Wadiche, J., Dineley-Miller, K., Dani, J. A. & Patrick, J. W. (1993). Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *Journal of Neurosciences*. 13(2): 596-604.
33. Couturier, S., Bertrand, D., Matter, J. M., Hernández, M. C., Bertrand, S., Millar, N., Valera, S., Barkas, T. & Ballivet, M. (1990). A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. *Neuron*. 5(6): 847-56.
34. Marty, A. (1981). Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature*. 291(5815): 497-500.

35. Artalejo, A. R., García, A. G. & Neher E. (1993). Small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in bovine chromaffin cells. *European Journal of Physiology*. 423(1-2): 97-103.
36. Neher, E. & Marty, A. (1982). Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* 79(21): 6712-6.
37. Abad-Santos, F. (1997). In vitro models for the study of nerve lesions and potential neuroprotective drugs. *Revista de Neurología* 25: 2015-21.
38. Baker, E. R., Zwart, R., Sher, E. & Millar, N. S. (2004). Pharmacological properties of  $\alpha 9 \alpha 10$  nicotinic acetylcholine receptors revealed by heterologous expression of subunit chimeras. *Molecular Pharmacology*. 65: 453-460.
39. Yokotani, K., Okada, S. & Nakamura, K. (2002). Characterization of functional nicotinic acetylcholine receptors involved in catecholamine release from the isolated rat adrenal gland. *European Journal of Pharmacology*. 446(1-3): 83-7.
40. Colquhoun, L. M. & Patrick, J. W. (1997). Pharmacology of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Advances in Pharmacology*. 39: 191-220.
41. McIntosh, J. M., Plazas, P. V., Watkins, M., Gomez-Casati, M. E., Olivera, B. M. & Elgoyhen, A. B. (2005). A novel  $\alpha$ -conotoxin, PeIA, cloned from *Conus pergrandis*, discriminates between rat  $\alpha 9 \alpha 10$  and  $\alpha 7$  nicotinic cholinergic receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 280(34): 30107-12.
42. Brandt, B. L., Hagiwara, S., Kidokoro, Y. & Miyazaki, S. (1976). Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *Journal of Physiology*. 263(3): 417-39.
43. Lingle, C. J., Solaro, C. R., Prakriya, M. & Ding, J. P. (1996). Calcium-activated potassium channels in adrenal chromaffin cells. *Ion Channels*. 4: 261-301.
44. Nassar-Gentina, V., Pollard, H. B. & Rojas, E. (1988). Electrical activity in chromaffin cells of intact mouse adrenal gland. *American Journal of Physiology*. 254(5 Pt 1): C675-83.
45. Holman, M. E., Coleman, H. A., Tonta, M. A. & Parkinson, H. C. (1994). Synaptic transmission from splanchnic nerves to the adrenal medulla of guinea pigs. *Journal of Physiology*. 478: 115-24.

**\*Información de Contacto:**

Dr. Antonio R. Artalejo.

Departamento de Toxicología y Farmacología. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

Avda. Puerta de Hierro, s/n. 28040, Madrid.

e-mail: antonio.artalejo@vet.ucm.es



## SESIONES CIENTÍFICAS

### 13 de enero

Solemne Sesión Inaugural del Curso Académico 2011 de la Real Academia Nacional de Farmacia. Discurso reglamentario a cargo del Excmo. Sr. D. Juan-Ramón Lacadena Calero, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

### 20 de enero

Conferencia del Dr. Jesús Moreno Sierra, Servicio de Urología en el Hospital Clínico San Carlos. Universidad Complutense de Madrid, titulado: “Cirugía robótica urológica en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid: Una apuesta por los procedimientos mínimamente invasivos”.

### 27 de enero

Conferencia de la Excma. Sra. Dña. María Cascales Angosto, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, sobre la Hipoxia.

### 3 de febrero

Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Dr. Antonio González Bueno, Prof. Titular del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica en la Facultad de Farmacia de la UCM, quien pronunció su discurso titulado: “Ciencia, trabajo y piedad: el quehacer farmacéutico en la España de la primera mitad del siglo XVIII”. Le presentó en nombre de la corporación el Excmo. Sr. D. Francisco Javier Puerto Sarmiento, Académico de Número de la RANF.

**10 de febrero**

Conferencia del Excmo. Sr. D. Manuel Domínguez Carmona, Académico de Número de la RANF, titulada: "Prevención actual del cáncer de cuello de útero".

**17 de febrero**

Conferencia del Dr. Víctor de Lorenzo, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, titulada: "De la Biología Molecular a la Biología de Sistemas: La segunda transición de las Ciencias de la Vida".

**24 de febrero**

Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Excmo. Sr. D. Isaac Arias Santos, Presidente de la Academia de Farmacia de Galicia, el cual pronunció el discurso titulado: "Criterio con sabiduría y autoridad, expresión de la responsabilidad institucional de las Academias de Farmacia". Laudatio escrito por el Excmo. Sr. D. José Luis Vila Jato, leído por la Excma. Sra. D<sup>a</sup> María Teresa Miras Portugal.

El día 16 de diciembre hubo votaciones en la RANF para la elección de Académicos de Número. Fue elegida Académica de Número la Profesora María Vallet Regí, con la medalla 42 del turno de ciencias afines en Junta General. Es la primera mujer en nuestra historia elegida en este turno. La Profesora Vallet es Premio Nacional de Investigación Leonardo Torres Quevedo. Nació en Las Palmas de Gran Canaria, se licenció y doctoró en la Facultad de Químicas de la Universidad Complutense de Madrid y es Catedrática de Química Inorgánica de esta misma Universidad. También ha investigado en la Universidad Joseph Fourier de Grenoble, Francia, y ha sido profesora invitada del Instituto Nacional Investigación en Materiales Inorgánicos de Tsukuba, en Japón y en la Universidad de Estocolmo. Además es autora de más de 500 publicaciones entre libros, monografías y capítulos de libros y pertenece a varios comités científicos en congresos internacionales, editoriales de revistas científicas y es académica de la Real Academia de Ingeniería. En el mismo acto fue elegido como Académico de Número con la Medalla 29 del turno de Farmacia el Profesor José M.<sup>a</sup> Medina Jiménez. El Profesor Medina es catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca y académico correspondiente de nuestra corporación. Además de poseer un extenso currículum ha participado en diversas actividades de la Academia. Su más reciente contribución ha sido un artículo en una monografía editada por nuestra Académica de Número Excma. Sra. Doña Ana María Pascual-Leone Pascual y que lleva el título de "Acción de las hormonas a nivel cerebral". La RANF tiene, además, un nuevo Académico de Honor, el célebre científico Mariano Barbacid, fue elegido para este cargo el 25 de noviembre en Junta General. Y otra elección, en este caso reelección, ha sido la del vicepresidente, el Excmo. Sr. D. Antonio Martínez y la del vicesecretario, el Excmo. Sr. D. José Miguel Ortiz Melón. Ambos fueron renovados en sus cargos el 9 de diciembre en Junta General. Este mismo día fue elegido para un nuevo mandato de 3 años el Excmo. Sr. D. Antonio Monge como Presidente de la Sección 1.<sup>a</sup>, por la propia sección.

\* \* \*

Un equipo internacional, con participación de científicos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), coordinado por el académico de número de nuestra corporación Guillermo Giménez, ha diseñado un nuevo fármaco capaz de bloquear con eficacia la entrada del virus del VIH en las células que va a infectar. Guillermo Giménez, trabaja en el Centro de Investigaciones Biológicas. El tratamiento, probado con éxito en ensayos clínicos en humanos, está basado en el derivado de un péptido que produce el propio organismo probablemente para defenderse de otros virus. Este péptido, denominado Virip, impedía que el VIH inyectase su contenido a través de la membrana celular. Los científicos comprobaron que por sí solo no servía como medicamento por su escasa eficacia. Para resolver este problema, sintetizaron unas 600 variantes de Virip hasta que dieron con una, denominada VIR-576, con una eficacia similar a otros medicamentos contra el sida y con apenas efectos secundarios. Para entrar en la célula e infectarla, el virus del SIDA necesita introducir en la membrana el extremo de una proteína denominada gp41. Lo que hace el VIR-576 es adherirse al extremo de esta proteína e impedir que entre en contacto con la membrana de la célula. “El fármaco envuelve la punta de una especie de arpón que el virus clava en la célula que va a infectar. Como la punta del arpón no puede ser alterada por el virus, éste no puede encontrar fácilmente atajos para hacerse inmune a VIR-576 y pierde, por tanto, su capacidad de infectar”, aclara Giménez. Los ensayos clínicos se realizaron en 18 pacientes infectados de sida, que fueron tratados durante diez días con tres dosis diferentes del VIR-576 diarias. Los pacientes con las dosis más altas redujeron los niveles del virus en sangre y toleraron bien el medicamento y apenas sufrieron efectos secundarios.

\* \* \*

El 27 de diciembre del pasado año falleció Manfred Anke, Profesor de toxicología de la nutrición en la Universidad de Jena (Alemania). El profesor Anke era académico correspondiente extranjero de nuestra corporación desde el año 2004. Su discurso de ingreso se tituló “Essentiality of arsenic, bromine, fluorine and titanium for animal and man” y fue presentado por el Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas.

\* \* \*

The Times Higher Education, una organización especializada en el análisis de la ciencia y la educación superior, ha publicado la lista de los TOP TEN en el mundo, en el área de Farmacología. Para la elaboración de este ranking hace uso de parámetros contrastados como es el grado de impacto de los trabajos científicos publicados medido por el número de citas. La RANF se congratula de contar con dos académicos en este ranking: el Profesor Robert Langer, Académico Correspondiente, quien ostenta el lugar número 5 y la Profesora María José Alonso, Académica de Número de la RANF y de la Academia de Farmacia de Galicia quien ostenta el lugar número 9. Robert Langer tiene el más alto reconocimiento como “Institute Professor” en el MIT. Es el ingeniero más citado en la historia. Ha recibido 180 premios de gran relevancia entre ellos el premio Príncipe de Asturias y el Millenium Prize (equivalente al premio Nobel para ingenieros). Ha sido el presidente de la comisión científica de la FDA. Es miembro de la Academia Nacional de Ciencia, de la Academia Nacional de Ingeniería y del Instituto de Medicina de la Academia Nacional de Ciencia de Estados Unidos. María José Alonso es catedrática de Farmacia y Tecnología Farmacéutica en la universidad de Santiago de Compostela. Ha sido pionera en España en el ámbito de la nanotecnología farmacéutica. Forma parte actualmente de las plataformas y asociaciones más prestigiosas a nivel internacional en el ámbito de la nanomedicina. Es uno de los científicos más citados en el mundo en el ámbito de la Farmacología.

La Dra. Icíar Astiasarán Anchía, Académica Correspondiente de nuestra corporación ha sido nombrada vicerrectora de Investigación de la Universidad de Navarra. Astiasarán, natural de Aretxabaleta (Guipúzcoa), ha sido decana de Farmacia desde 2004. Licenciada (1982) y doctora (1985) en Farmacia por la UN, obtuvo en 2006 la cátedra en Nutrición y Bromatología. Es también académica de Número de la Academia Vasca de las Ciencias, las Artes y las Letras. En 2006 la Diputación Foral de Guipúzcoa le otorgó la Medalla de Oro por su “trayectoria científica en materia de Nutrición, Dietética y Seguridad Alimentaria”.

\* \* \*



## **ÍNDICES DEL AÑO 2010**

I. **ÍNDICE DE AUTORES**

II. **ÍNDICE DE MATERIAS**

## ÍNDICE DE AUTORES

- ALCÁNTARA LEÓN, A. R.; SÁNCHEZ MONTERO, J. M. — Utilización de hidrolasas en la preparación de fármacos e intermedios homoquirales.— **Pág. 259**
- ALONSO BEATO, M. T. —Véase LADERO ÁLVAREZ, M.— **On line**
- ÁLVAREZ-GÓMEZ, J. A. —Véase CASCALES ANGOSTO, M.— **Pág. 59**
- AMOR MORALES, A. —Véase LADERO ÁLVAREZ, M.— **On line**
- ARTALEJO, A. R. —Véase OLIVOS-ORÉ, L. A.— **Pág. 435**
- AVENDAÑO, M. C. —El Premio Nobel en Química 2010.— **Pág. 541**
- BARAHONA GOMARIZ, M. V. — Véase OLIVOS-ORÉ, L. A.— **Pág. 435**
- BARRI, P. N.; COROLEU, B.; CLUA, E.; TUR, R. —Conmemorando el Premio Nobel 2010 de Medicina. Transferencia selectiva de un embrión como prevención del embarazo múltiple.— **Pág. 531**
- BARTOLOMÉ, A.; GUILLÉN, C.; BENITO, M. —TSC1-TSC2 complex on the crossroad of pancreatic  $\beta$  cell signaling. Role on cell proliferation, death and survival.— **Pág. 357**
- BENEDÍ GONZÁLEZ, J. —Véase EL HADRI, A.— **Pág. 343**
- BENITO, M. —Véase BARTOLOMÉ, A.— **Pág. 357**
- BENITO DE LAS HERAS, M. —Véase ESCRIBANO, O.— **Pág. 23**
- BLASCO, M. A. —El Ying y el Yang de los telómeros: cáncer y envejecimiento.— **Pág. 105**
- BOTICARIO BOTICARIO, C.; CASCALES ANGOSTO, M. C. —Hipoxia y cáncer.— **Pág. 379**
- BUSTILLO, D. —Véase OLIVOS-ORÉ, L. A.— **Pág. 435**
- CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A. —La gripe A/H1N1(2009) y su tratamiento: Resumen de sus principales aspectos.— **Pág. 241**
- CASCALES ANGOSTO, M.; ÁLVAREZ-GÓMEZ, J. A. —Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer.— **Pág. 59**
- CASCALES ANGOSTO, M. C. —Véase BOTICARIO BOTICARIO, C.— **Pág. 379**
- CLUA, E. —Véase BARRI, P. N.— **Pág. 531**
- COROLEU, B. —Véase BARRI, P. N.— **Pág. 531**
- CORTÉS CABRERA, A.; RUEDA PÉREZ, C. —Prediction of ligand binding energy and anti-inflammatory effect of flavonoids in the glucocorticoid

- receptor by molecular dynamics simulations and linear interaction energy method.— **Pág. 223**
- COSTAS, E. —Véase LÓPEZ-RODAS, V.— **Pág. 189**
- DE LA ROSA JORGE, M. C. —Véase MOSSO ROMEO, M. A.— **On line**
- DÍAZ-FIERROS VIQUEIRA, F. — El evolucionismo de Rodríguez Carracido. Nuevas consideraciones.— **Pág. 479**
- EL HADRI, A.; GÓMEZ DEL RÍO, M. A.; SANZ, J.; GONZÁLEZ COLOMA, A.; IDAOMAR, M.; RIBAS OZONAS, B.; BENEDÍ GONZÁLEZ, J.; SÁNCHEZ REUS, M. I. —Cytotoxic activity of  $\alpha$ -humulene and trans-caryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells.— **Pág. 343**
- ESCRIBANO, O.; GÓMEZ-HERNÁNDEZ, A., BENITO DE LAS HERAS, M. —Hiperplasia de célula beta inducida por resistencia hepática a insulina: Papel de un eje hepato-pancreático.— **Pág. 23**
- ESTEBAN, M. —Véase GARCÍA, M. A.— **Pág. 327**
- FERNÁNDEZ TORNERO, C. —Nobel de Química 2009: estructura atómica de la maquinaria celular para sintetizar proteínas.— **Pág. 119**
- FRANCÉS CAUSAPÉ, M. C.; LÓPEZ GONZÁLEZ, M. —El Balneario Baños de La Concepción de Villatoya (Albacete). Historia y Generalidades.— **On line**
- GALVÁN RAMÍREZ, Y. —Véase MANTERO SÁENZ, F. J.— **On line**
- GÁLVEZ, J. —Véase GARCÍA-DOMÉNECH, R.— **Pág. 45**
- GARCÍA, M. A.; KRUPA, M.; ESTEBAN, M. —Antitumoral activity of oncolytic vaccinia virus expressing the interferon-induced ds-RNA dependent protein kinase PKR.— **Pág. 327**
- GARCÍA-DOMÉNECH, R.; MONTEALEGRE, M. C.; NAGHAM, E. G.; SANDOVAL, N.; SANTANA, M.; GÁLVEZ, J. —Aplicación de la topología molecular para la predicción de la actividad anti-HIV-1 de un grupo de compuestos análogos del aciclovir y ganciclovir.— **Pág. 45**
- GARCÍA MATA, M. —Véase TORIJA ISASA, M. E.— **On line**
- GASCÓ LEONARTE, C. —Véase HERAS ÍÑIGUEZ, M. C.— **On line**
- GÓMEZ DEL RÍO, M. A. —Véase EL HADRI, A.— **Pág. 343**
- GÓMEZ-HERNÁNDEZ, A. —Véase ESCRIBANO, O.— **Pág. 23**
- GONZÁLEZ, R. —Véase LÓPEZ-RODAS, V.— **Pág. 189**
- GONZÁLEZ BUENO, A.; RODRÍGUEZ NOZAL, R. —Innovation vs. tradition: the election of an european way toward pharmaceutical industrialisation, 19<sup>th</sup>-20<sup>th</sup> centuries.— **Pág. 459**

- GONZÁLEZ COLOMA, A. —Véase EL HADRI, A.— **Pág. 343**
- GONZÁLEZ IGLESIAS, F. J. —Véase LADERO ÁLVAREZ, M.— **On line**
- GUILLÉN, C. —Véase BARTOLOMÉ, A.— **Pág. 357**
- HERAS ÍÑIGUEZ, M. C.; SUÁÑEZ FIDALGO, A. M.; GASCÓ LEONARTE, C.; ROMERO DEL HOMBREBUENO POZUELO, B.; TRINIDAD RUIZ, J. A.; SIMÓN ARAUZO, M. A. —Análisis de la radiactividad en aguas del Balneario de Baños de la Concepción.— **On line**
- HERNÁNDEZ RUIZ DE EGUILAZ, M.; MARTÍNEZ DE MORTENTÍN, B.; PÉREZ-DIEZ, S.; NAVAS-CARRETERO, S.; MARTÍNEZ, A. J. —Estudio comparativo de medidas de composición corporal por absorciometría dual de rayos X, bioimpedancia y pliegues cutáneos en mujeres.— **Pág. 209**
- IDAOMAR, M. —Véase EL HADRI, A.— **Pág. 343**
- KRUPA, M. —Véase GARCÍA, M. A.— **Pág. 327**
- LACADENA CALERO, J. R. —El premio Nobel 2009 en Fisiología o Medicina: Telómeros y telomerasa: de la investigación citogenética básica a la aplicación clínica. El premio Nobel 2009 en Química: Estructura atómica del ribosoma: estructura y función en el corazón de la genética.— **Pág. 87**
- LACADENA CALERO, J. R. —La fecundación in vitro, Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2010.— **Pág. 519**
- LADERO ÁLVAREZ, M.; MOLINA CANTOS, R.; LUENGO UGIDOS, M. A.; AMOR MORALES, A.; SANTOS BOBILLO, M. T.; ALONSO BEATO, M. T.; GONZÁLEZ IGLESIAS, F. J.; LADERO SANTOS, I.; VALDÉS FRANZI, A. —Estudio de la vegetación del entorno del Balneario de Baños de la Concepción, Villatoya (Albacete).— **On line**
- LADERO SANTOS, I. —Véase LADERO ÁLVAREZ, M.— **On line**
- LEÓN NAVARRO, D. —Véase SALAS, E.— **Pág. 3**
- LÓPEZ COLÓN, J. L. —Véase TORIJA ISASA.— **On line**
- LÓPEZ GONZÁLEZ, M. —Véase FRANCÉS CAUSAPÉ, M. C.— **On line**
- LÓPEZ-RODAS, V.; GONZÁLEZ, R.; COSTAS, E. —The ignored stowaways: worldwide dispersion of exotic microalgae species through the biofouling recovering the ships underwater body.— **Pág. 189**
- LUENGO UGIDOS, M. A. —Véase LADERO ÁLVAREZ, M.— **On line**
- MANTERO SÁENZ, F. J.; GALVÁN RAMÍREZ, Y. —Climato-

- logía del Balneario de Baños de la Concepción.— **On line**
- MARÍN-GARCÍA, P. —Véase SALAS, E.— **Pág. 3**
- MARTÍNEZ, J. A. —Véase HERNÁNDEZ RUIZ DE EGUILAZ, M.— **Pág. 209**
- MARTÍNEZ DE MORENTÍN, B. —Véase HERNÁNDEZ RUIZ DE EGUILAZ, M.— **Pág. 209**
- MIRAS PORTUGAL, M. T. —Véase SALAS, E.— **Pág. 3**
- MOLINA CANTOS, R. —Véase LADERO ÁLVAREZ, M.— **On line**
- MONTEALEGRE, M. C. —Véase GARCÍA-DOMÉNECH, R.— **Pág. 45**
- MONTURIOL, F. —Estudio edafológico del término de Villatoya.— **On line**
- MOSSO ROMEO, M. A.; DE LA ROSA JORGE, M. C. —Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción.— **On line**
- NAGHAM, E. G. —Véase GARCÍA-DOMÉNECH, R.— **Pág. 45**
- NAVAS-CARRETERO, S. —Véase HERNÁNDEZ RUIZ DE EGUILAZ, M.— **Pág. 209**
- OLIVOS-ORÉ, L. A.; BARAHONA GOMARIZ, M. V.; BUSTILLO, D.; SÁNCHEZ-NOGUEIRO, J.; ARTALEJO, A. R. —Caracterización farmacológica y análisis funcional de los receptores nicotínicos  $\alpha 9\alpha 10$  en células cromafines aisladas de la médula adrenal de rata.— **Pág. 435**
- PÉREZ-DIEZ, S. —Véase HERNÁNDEZ RUIZ DE EGUILAZ, M.— **Pág. 209**
- RIBAS OZONAS, B. —Véase EL HADRI, A.— **Pág. 343**
- RODRÍGUEZ NOZAL, R. —Véase GONZÁLEZ BUENO, A.— **Pág. 459**
- ROMERO DEL HOMBREBUENO POZUELO, B. —Véase HERAS ÍÑIGUEZ, M. C.— **On line**
- ROSINO ROSINO, J. M. —Geología e Hidrogeología del Balneario Baños de La Concepción. Villatoya (Albacete).— **On line**
- RUEDA PÉREZ, C. —Véase CORTÉS CABRERA, A.— **Pág. 223**
- SALAS, E.; LEÓN NAVARRO, D.; SÁNCHEZ-NOGUEIRO, J.; MARÍN-GARCÍA, P.; MIRAS PORTUGAL, M. T. —Interacción entre receptores de glutamato y receptores de nucleótidos en neuronas granulares de cerebelo en cultivo.— **Pág. 3**
- SAN MARTÍN BACAICOA, J.; VALERO CASTEJÓN, A. —Estudio de la acción terapéutica de las aguas del Balneario Baños de La Concepción de Villatoya (Albacete).— **On line**
- SÁNCHEZ MONTERO, J. M. —Véase ALCÁNTARA LEÓN, A. R.— **Pág. 259**
- SÁNCHEZ-NOGUEIRO, J. —Véase SALAS, E.— **Pág. 3**

- SÁNCHEZ-NOGUEIRO, J. —Véase OLIVOS-ORÉ, L. A.— **Pág. 435**
- SÁNCHEZ REUS, M. I. —Véase EL HADRI, A.— **Pág. 343**
- SANDOVAL, N. —Véase GARCÍA-DOMÉNECH, R.— **Pág. 45**
- SANTANA, M. —Véase GARCÍA-DOMÉNECH, R.— **Pág. 45**
- SANTOS BOBILLO, M. T. —Véase LADERO ÁLVAREZ, M.— **On line**
- SANZ, J. —Véase EL HADRI, A.— **Pág. 343**
- SIMÓN ARAUZO, M. A. —Véase HERAS ÍÑIGUEZ, M. C.— **On line**
- SUÁÑEZ FIDALGO, A. M. —Véase HERAS ÍÑIGUEZ, M. C.— **On line**
- TENORIO SANZ, M. D. —Véase TORIJA ISASA, M. E.— **On line**
- TORIJA ISASA, M. E., GARCÍA MATA, M., TENORIO SANZ, M. D., LÓPEZ COLÓN, J. L. —Análisis Físico-Químico de las aguas del Balneario de Baños de la Concepción.— **On line**
- TRINIDAD RUIZ, J. A. —Véase HERAS ÍÑIGUEZ, M. C.— **On line**
- TUR, R. —Véase BARRI, P. N.— **Pág. 531**
- TUTOR, J. C. —La energía de activación como marcador de heterogeneidad enzimática: Utilidad en bioquímica clínica.— **Pág. 493**
- VALERO CASTEJÓN, A. —Véase SAN MARTÍN BACAICOA, J.— **On line**
- VALÉS FRANZI, A. —Véase LADERO ÁLVAREZ, M.— **On line**

## ÍNDICE ALFABÉTICO DE MATERIAS

- $\alpha$ -amilasa.— **Pág. 493**  
Abiogénesis.— **Pág. 479**  
Absorciometría dual de Rayos X.— **Pág. 209**  
Actividad anti-VIH-1.— **Pág. 45**  
Actividad oncolítica.— **Pág. 327**  
Adaptación.— **Pág. 189**  
Agua minero-medicinal.— **On line**  
Aguas mineromedicinales.— **On line**  
Alanino aminopeptidasa.— **Pág. 493**  
Albacete.— **On line**  
Alfa-humuleno.— **Pág. 343**  
Algas tóxicas.— **Pág. 189**  
Análisis de regresión multilíneal.— **Pág. 45**  
Análisis físico-químico.— **On line**  
Análogos del acyclovir y ganciclovir.— **Pág. 45**  
Antibióticos.— **Pág. 119**  
Antropometría y composición corporal.— **Pág. 209**  
Aspartato aminotransferasa.— **Pág. 493**  
 $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa.— **Pág. 493**  
Balneario.— **On line**  
Balneario Baños La Concepción.— **On line**  
Balneario de la Concepción.— **On line**  
Balnearios.— **On line**  
Biocatalizadores.— **Pág. 259**  
Bioclimatología.— **On line**  
Biodiversidad.— **On line**  
Biofouling.— **Pág. 189**  
Bioimpedancia.— **Pág. 209**  
Biotapetes.— **On line**  
Biotransformaciones.— **Pág. 259**  
Calcio-calmodulina-quinasa II.— **Pág. 3**  
Canales SK.— **Pág. 435**  
Cáncer.— **Pág. 59**  
Características y propiedades.— **On line**  
Castilla-La Mancha.— **On line**  
Célula beta.— **Pág. 357**  
Célula cromafín.— **Pág. 435**  
Citotoxicidad.— **Pág. 343**  
Confort.— **On line**  
Creatina kinasa.— **Pág. 493**  
Cristalografía de rayos X.— **Pág. 119**  
Diabetes.— **Pág. 3, 357**  
Dinámica molecular.— **Pág. 223**  
Docking.— **Pág. 223**  
Embarazo múltiple.— **Pág. 531**  
Energía de activación.— **Pág. 493**  
España.— **On line**  
Especies introducidas.— **Pág. 189**  
Esterilidad.— **Pág. 531**  
Europa.— **Pág. 459**  
Evolucionismo.— **Pág. 479**  
Factor inducible por hipoxia.— **Pág. 379**  
Factores y procesos.— **On line**  
Farmacéuticos.— **On line**  
Fármacos.— **Pág. 259**  
Fitosociología.— **On line**  
Flavonoides.— **Pág. 223**  
Fosfatasa alcalina.— **Pág. 493**

- $\gamma$ -Glutamyltransferasa.— **Pág. 493**  
 Génesis albuminoides.— **Pág. 479**  
 Geología.— **On line**  
 Gripe A.— **Pág. 241**  
 Gripe A/H1N1.— **Pág. 241**  
 Gripe A/H1N1(2009).— **Pág. 241**  
 Gripe “mexicana”.— **Pág. 241**  
 Gripe porcina.— **Pág. 241**  
 HABs.— **Pág. 189**  
 Heterogeneidad enzimática.— **Pág. 493**  
 Hidrogeología.— **On line**  
 Hidrolasas.— **Pág. 259**  
 HIF-1.— **Pág. 379**  
 Hipoxia.— **Pág. 379**  
 Historia.— **Pág. 459**  
 IGF-I.— **Pág. 23**  
 Índice de masa corporal.— **Pág. 209**  
 Industria farmacéutica.— **Pág. 459**  
 Insulina.— **Pág. 357**  
 Interacción.— **Pág. 3**  
 La Concepción.— **On line**  
 Lactato deshidrogenasa.— **Pág. 493**  
 Manantiales termales.— **On line**  
 Matriz extracelular.— **Pág. 59**  
 Metaloproteinasas.— **Pág. 59**  
 Metástasis.— **Pág. 59**  
 Microbiota autóctona.— **On line**  
 Modelo ratón.— **Pág. 327**  
 mTORC1.— **Pág. 357**  
 5'-Nucleotidasa.— **Pág. 493**  
 Oseltamivir.— **Pág. 241**  
 Pacientes.— **On line**  
 Pandemia de gripe.— **Pág. 241**  
 Periodo de semidesintegración.— **On line**  
 Pliegues cutáneos.— **Pág. 209**  
 Potencial de membrana.— **Pág. 435**  
 Prematuridad.— **Pág. 531**  
 Proliferación.— **Pág. 373**  
 Protección.— **On line**  
 Proteína quinasa PKR.— **Pág. 327**  
 Radiactividad.— **On line**  
 Radionucleido.— **On line**  
 Ratón.— **Pág. 23**  
 Receptor glucocorticoides.— **Pág. 223**  
 Receptor nicotínico.— **Pág. 435**  
 Receptores de Glutamato.— **Pág. 3**  
 Receptores P2.— **Pág. 3**  
 Relaciones cuantitativas estructural-actividad.— **Pág. 45**  
 Relenza.— **Pág. 241**  
 Ribosoma.— **Pág. 119**  
*Salvia officinalis*.— **Pág. 343**  
 Señalización.— **Pág. 23**  
 Series radiactivas.— **On line**  
 Sesquiterpenos.— **Pág. 343**  
 Síntesis de proteínas.— **Pág. 119**  
 Suelos.— **On line**  
 Tamiflu.— **Pág. 241**  
 TBT.— **Pág. 189**  
 Temperatura efectiva.— **On line**  
 Terapia anti-cáncer.— **Pág. 59**  
 Terapia del cáncer.— **Pág. 379**  
 Tipología.— **On line**  
 Topología molecular.— **Pág. 45**  
 Traducción.— **Pág. 119**  
 Trans-cariofileno.— **Pág. 343**  
 Transferencia selectiva de un embrión.— **Pág. 531**  
 TSC2.— **Pág. 357**  
 Tumor de próstata.— **Pág. 327**  
 Usos del suelo.— **On line**

Vacunas contra la gripe A.— **Pág. 241**

Vegetación.— **On line**

Villatoya.— **On line**

Virus vaccinia recombinante.—  
**Pág. 327**

Zanamivir.— **Pág. 241**



# RELACIÓN DE PUBLICACIONES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

## 1. Publicaciones Periódicas

### 1.1. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*

Tomo I, Año 1932, n<sup>o</sup>s 1-4  
Tomo II, Año 1933, n<sup>o</sup>s 1-4  
Tomo III, Año 1934, n<sup>o</sup>s 1-4  
Tomo IV, Año 1935, n<sup>o</sup>s 1-4  
Tomo V, Año 1936, n<sup>o</sup>s 1-4  
2<sup>a</sup> Época (Año VI), Tomo I, Año 1940, n<sup>o</sup>s 1-6  
2<sup>a</sup> Época (Año VII), Tomo II, Año 1941, n<sup>o</sup>s 1-6  
2<sup>a</sup> Época (Año VIII), Tomo III, Año 1942, n<sup>o</sup>s 1-6  
Año IX, 1943, n<sup>o</sup>s 1-6  
Año X, 1944, n<sup>o</sup>s 1-6  
Año XI, 1945, n<sup>o</sup>s 1-4  
Año XII, 1946, n<sup>o</sup>s 1-4  
Año XIII, 1947, n<sup>o</sup>s 1-6  
Año XIV, 1948, n<sup>o</sup>s 1-6  
Año XV, 1949, n<sup>o</sup>s 1-6  
Año XVI, 1950, n<sup>o</sup>s 1-6  
Año XVII, 1951, n<sup>o</sup>s 1-6  
Año XVIII, 1952, n<sup>o</sup>s 1-6  
Año XIX, 1953, n<sup>o</sup>s 1-6  
Año XX, 1954, n<sup>o</sup>s 1-6  
Año XXI, 1955, n<sup>o</sup>s 1-6  
Año XXII, 1956, n<sup>o</sup>s 1-6  
Año XXIII, 1957, n<sup>o</sup>s 1-6  
Año XXIV, 1958, n<sup>o</sup>s 1-6  
Año XXV, 1959, n<sup>o</sup>s 1-6  
Volumen XXVI, Año 1960, n<sup>o</sup>s 1-6  
Volumen XXVII, Año 1961, n<sup>o</sup>s 1-6  
Volumen XXVIII, Año 1962, n<sup>o</sup>s 1-6  
Volumen XXIX, Año 1963, n<sup>o</sup>s 1-6  
Volumen XXX, Año 1964, n<sup>o</sup>s 1-6

Volumen XXXI, Año 1965, n<sup>o</sup>s 1-6  
Volumen XXXII, Año 1966, n<sup>o</sup>s 1-6  
Volumen XXXIII, Año 1967, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen XXXIV, Año 1968, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen XXXV, Año 1969, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen XXXVI, Año 1970, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen XXXVII, Año 1971, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen XXXVIII, Año 1972, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen XXXIX, Año 1973, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen XL, Año 1974, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen XLI, Año 1975, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen XLII, Año 1976, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen XLIII, Año 1977, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen XLIV, Año 1978, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen XLV, Año 1979, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen XLVI, Año 1980, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen XLVII, Año 1981, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen XLVIII, Año 1982, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen XLIX, Año 1983, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen L, Año 1984, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen LI, Año 1985, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen LII, Año 1986, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen LIII, Año 1987, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen LIV, Año 1988, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen LV, Año 1989, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen LVI, Año 1990, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen LVII, Año 1991, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen LVIII, Año 1992, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen LIX, Año 1993, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen LX, Año 1994, n<sup>o</sup>s 1-4 y apéndice  
Volumen LXI, Año 1995, n<sup>o</sup>s 1-4 y apéndice  
Volumen LXII, Año 1996, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen LXIII, Año 1997, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen LXIV, Año 1998, n<sup>o</sup>s 1-4  
Volumen LXV, Año 1999, n<sup>o</sup>s 1-4 y extraordinario.  
Volumen LXVI, Año 2000, n<sup>o</sup>s 1-4.  
Volumen LXVII, Año 2001, n<sup>o</sup>s 1-4 y extraordinario.  
Volumen LXVIII, Año 2002, n<sup>o</sup>s 1-4 y extraordinario.  
Volumen LXIX, Año 2003, n<sup>o</sup>s 1-4 y extraordinario.

Volumen LXX, Año 2004, n°s 1-4 y extraordinario.

Volumen LXXI, Año 2005, n° 1-4

Volumen LXXII, Año 2006, n°s 1-4 y extraordinario.

Volumen LXXIII, Año 2007, n°s 1-4 y extraordinario.

Volumen LXXIII, Año 2008, n°s 1-4 y extraordinario.

Volumen LXXIV, Año 2009, n°s 1-4 y 2 extraordinarios.

Volumen LXXV, Año 2010, n°s 1-4 y extraordinario (on line).

Agotados los años desde 1932 a 1969 completos.

Agotado n° 2, Año 1977 Vol. XLIII; n°s 1 y 2, Año 1978 Vol. XLIII; n° extraordinario, Año 2002 Vol LXVIII.

## 1.2. *Anuarios*

- Anuario n° 1, Año 1948
- Anuario n° 2, Año 1949
- Anuario n° 3, Año 1950
- Anuario n° 4, Año 1951
- Anuario n° 5, Año 1952
- Anuario n° 6, Año 1953
- Anuario n° 7, Año 1954
- Anuario n° 8, Año 1955
- Anuario n° 9, Año 1956
- Anuario n° 10, Año 1957
- Anuario n° 11, Año 1958
- Anuario n° 12, Año 1959
- Anuario n° 13, Año 1960
- Anuario n° 14, Año 1961
- Anuario n° 15, Año 1962
- Anuario n° 16, Año 1963
- Anuario n° 17, Año 1964
- Anuario n° 18, Año 1965
- Anuario n° 19, Año 1966
- Anuario n° 20, Año 1967
- Anuario n° 21, Año 1968
- Anuario n° 22, Año 1969
- Anuario n° 23, Año 1970
- Anuario n° 24, Año 1971
- Anuario n° 25, Año 1972

- Anuario n° 26, Año 1973
- Anuario n° 27, Año 1974
- Anuario n° 28, Año 1975
- Anuario n° 29, Año 1976
- Anuario n° 30, Año 1977
- Anuario n° 31, Año 1978
- Anuario n° 32, Año 1979
- Anuario n° 33, Año 1980
- Anuario n° 34, Año 1981
- Anuario n° 35, Año 1982
- Anuario n° 36, Año 1983
- Anuario n° 37, Año 1984
- Anuario n° 38, Año 1985
- Anuario n° 39, Año 1986
- Anuario n° 40, Año 1987
- Anuario n° 41, Año 1988
- Anuario n° 42, Año 1989
- Anuario n° 43, Año 1990
- Anuario n° 44, Año 1991
- Anuario n° 45, Año 1992
- Anuario n° 46, Año 1993
- Anuario n° 47, Año 1995
- Anuario n° 48, Año 1996
- Anuario n° 49, Año 1997
- Anuario n° 50, Año 1998
- Anuario n° 51, Año 1999
- Anuario n° 52, Año 2000
- Anuario n° 53, Año 2001
- Anuario n° 54, Año 2002
- Anuario n° 55, Año 2003
- Anuario n° 56, Año 2004
- Anuario n° 57, Año 2005
- Anuario n° 58, Año 2006
- Anuario n° 59, Año 2007
- Anuario n° 60, Año 2008
- Anuario n° 61, Año 2009
- Anuario n° 62, Año 2010

Agotados n°s 1 al 27 (1948-1974); n° 31 (1978); n° 33 (1980); n° 52 (2000).

## 2. Monografías

### 2.1. *Monografías de Aguas Mineromedicinales*

Caldelas de Tuy (Agotada)	1968
Caldas de Cuntis	1974
Montemayor (Agotada)	1975
Corconte (Agotada)	1976
Ledesma (Agotada)	1977
Solán de Cabras (Primera edición agotada)	1978
(Segunda edición) (Agotada)	1980
Lanjarón	1980
Carabaña	1981
Alhama de Aragón	1983
Caldas de Montbui	1984
Fuente Amarga de Chiclana de la Frontera	1985
Archena	1986
Fortuna	1987
Arnedillo	1988
Caldas de Bohi	1989
Alange	1990
El clima en algunos balnearios	1990
Fitero	1991
La Toja	1993
Lugo	1994
Blancafort	1995
Hervideros de Cofrentes	1998
Carratraca	1999
El Paraíso de Manzanera	2001
Alhama de Granada (Agotada)	2002
Balneario de Jaraba (Agotada)	2004
Balneario de Cervantes	2006
Balneario de Puente Viesgo	2007
Balneario de Valdelateja	2008
Balneario de Alicún de las Torres	2009
Baños de la Concepción de Villatoya (Albacete) (on line)	2010

## 2.2. *Serie de monografías de actualización en Ciencias Farmacéuticas*

- Diseño de Medicamentos. Publicada en colaboración con Farmaindustria en 1994. Coordinador: Dr. Arturo Mosqueira Toribio.
- Proliferación celular y cáncer. Publicada en colaboración con la Asociación Española Contra el Cáncer en 1994. Coordinadores: Dra María Cascales y Dr. Julio Rodríguez Villanueva.
- Autoinmunidad Algunos aspectos básicos y clínicos. Publicada en colaboración con la Hermandad Farmacéutica del Mediterráneo en 1996. Coordinador: Dr. Antonio Portolés Alonso.
- Bioquímica y Fisiopatología del estrés oxidativo. Publicada en colaboración con la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Coordinador: Dra. María Cascales Angosto.
- Los residuos y sus riesgos para la salud. Publicada en colaboración con ENRESA, TEDEC-MEIJU FARMACIA, CAJA MADRID, Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. 1998. Coordinador: Dr. Segundo Jiménez Gómez.
- Alimentos y Salud. 2000. Coordinador: Dr. Bernabé Sanz Pérez.
- Salud, Educación y Energía Recursos cualificados para el Siglo XXI. Publicada en colaboración con ENRESA y Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia de Farmacia. 2001. Coordinador: Dr. Segundo Jiménez Gómez.
- Proliferación celular y cáncer 2000. Publicada en colaboración de la Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer. 2001. Coordinador: Dra. María Cascales Angosto.
- Antecedentes históricos de las Facultades de Ciencias Químicas, Biología y Farmacia de la Universidad de Salamanca. 2001. Coordinador: Dr. José Antonio Cabezas Fernández del Campo.
- La Salud, prioridad en el VI Programa de Medio Ambiente de la Unión Europea. Foro de reflexión y difusión del conocimiento (29 de octubre a 8 de noviembre del 2001). 2002. Coordinador: Dr. León Villanúa Fungairiño.
- Bioquímica y Fisiopatología del Envejecimiento. 2003. Coordinadores: Dra. María Cascales Angosto, Dr. José Antonio Cabezas Fernández del Campo y Dr. Pedro García Barreno.

- Temas escogidos de Seguridad Alimentaria. 2003. Coordinadores: Dr. Bernabé Sanz Pérez y Dr. Manuel Domínguez Carmona.
- Citocromo P450. 2004. Coordinadores: Dra. María Cascales Angosto y Dra. M.<sup>a</sup> José Gómez Lechón.
- Nuevos Avances en Medicamentos. 2004. Coordinadores: Dra. M.<sup>a</sup> Carmen Avendaño y Dr. Juan Tamargo Menéndez.
- Agresivos químicos y microbiológicos en la guerra y el terrorismo. 2005. Coordinador: Dr. Manuel Domínguez Carmona.
- Las Ómicas: Genómica, Proteómica, Citómica y Metabolómica. Nuevas tecnologías para el desarrollo de fármacos. 2005. Coordinadores: Dra. María Cascales Angosto, Dra. M.<sup>a</sup> José Gómez-Lechón y Dr. José E. O'Connor Blasco.
- Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: Patologías. 2005. Coordinador: Dra. Ana María Pascual-Leone Pascual.
- Liberación de fármacos en matrices biocerámicas: avances y perspectivas. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y la Fundación "José Casares Gil" de Amigos de la Real Academia de Farmacia. 2006. Coordinadores: Dra. María Vallet Regí y Dr. Antonio Luis Doadrio Villarejo.
- Enfermedades metabólicas. Publicada en colaboración con CAJA MADRID, Fundación Ramón Areces y Fundación "José Casares Gil" de Amigos de la Real Academia de Farmacia. 2006. Coordinadores: Dr. Federico Mayor Zaragoza y Dra. María Cascales Angosto.
- Influenza aviar y gripe humana de origen aviario. 2006. Coordinador: Dr. Bernabé Sanz Pérez.
- Contaminación y salud. Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación "José Casares Gil" de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2007. Coordinadores: Dr. Segundo Jiménez Gómez y Dr. Antonio L. Doadrio Villarejo.
- Desarrollo perinatal: origen de patologías adultas. Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación "José Casares Gil" de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia,

- Fundación Ramón Areces, Instituto de España. 2008. Coordinadores: Dra. Ana M.<sup>a</sup> Pascual-Leone Pascual y Dr. José M.<sup>a</sup> Medina.
- Redes de Señalización y Estrategias Terapéuticas. Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2009. Coordinadores: Dr. José Miguel Ortiz Melón y Dra. María Cascales Angosto.
  - Avances en Neurociencia: Neurotransmisores y Patologías Nerviosas. Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España. 2009. Coordinadores: Dra. María Teresa Miras Portugal y Dr. Antonio Rodríguez Artalejo.
  - José Celestino Mutis en el Bicentenario de su fallecimiento (1808-2008). Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Coordinador: Dr. Bartolomé Ribas Ozonas. 2009.
  - Células Madre y Terapia Regenerativa. Publicada en colaboración con la Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, Fundación Vodafone España. 2009. Coordinadores: Dra. Flora de Pablo Dávila y Dra. María Cascales Angosto.
  - Nanotecnología Farmacéutica. Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2009. Coordinador: Dr. José Luis Vila Jato.
  - Acción de las hormonas a nivel cerebral. Publicada en colaboración con la Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España y Fundación Ramón Areces. 2010. Coordinadora: Dra. Ana María Pascual-Leone Pascual.
  - Biomarcadores: Analítica, Diagnóstico y Terapéutica. Publicada en colaboración con la Fundación CAJAMADRID y la Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2010. Coordinador: Dr. Fidel Ortega Ortiz de Apodaca.

- Aspectos higiénicos de los alimentos microbiológicamente seguros. Publicada en colaboración con la Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2010. Coordinador: Dr. Bernabé Sanz Pérez.

### 2.3. *Otras Monografías*

- Sesión Científica en homenaje al Excmo. Sr. D. Rafael Roldán y Guerrero en el centenario de su nacimiento. Año 1989. (Agotado).
- Número monográfico conmemorativo del II Centenario de la muerte de Lavoisier. Apéndice de los Anales de la Real Academia de Farmacia, 1994.
- Número monográfico sobre temas de Actualidad Farmacológica. Apéndice de los Anales de la Real Academia de Farmacia, 1995.
- Sesión Científica en homenaje a Severo Ochoa. 1996.
- Ayer y Hoy de las Academias. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- El Genoma Humano Ciencia y Ética. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Toxicología Ambiental. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Farmacocinética. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Biotecnologías aplicadas a la producción de medicamentos y vacunas. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Patentes y Biopatentes. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Parasitismo y Desarrollo. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Patogenia de Iones Metálicos. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.

- Uso actual de las plantas medicinales cultivadas. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- El uso ilegítimo de los agentes químicos. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- El SIDA Un reto a la Ciencia y a la Sociedad. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Clausura de las Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Investigación y siglo XXI. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 1999.
- Prescripción, Dispensación y Evidencia Científica (Medicina basada en la evidencia). Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación “José Casares Gil” de amigos de la Real Academia de Farmacia, 1999.
- Las especialidades Farmacéuticas Genéricas y los Precios de Referencia. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación “José Casares Gil” de amigos de la Real Academia de Farmacia.
- Genómica y Farmacogenómica. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2002.
- La Universidad de Hoy y los Farmacéuticos de mañana. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2002.
- Infección por VIH y SIDA. Publicada en colaboración con SEISIDA (Sociedad Española Interdisciplinaria del SIDA); Instituto de Salud Carlos III; GlaxoSmithKline y Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2002.
- Farmacoeconomía e Investigación de Resultados en la Salud Principios y Práctica. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y la Fundación «José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia». 2002. Coordinador: Dr. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé y Dr. Javier Soto Álvarez.

- Sesión Extraordinaria conmemorativa del centenario del nacimiento del Excmo. Sr. D. José María Albareda Herrera. Coordinador: Antonio Portolés Alonso. (separata del num. 2; Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia). 2002.
- Modificadores de la respuesta biológica. Publicada en colaboración con CAJAMADRID y la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2003.
- Autocuidado de la Salud. Publicada en colaboración con CAJAMADRID y la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Coordinación: Asociación para el Autocuidado de la Salud (ANEFP). 2003.
- Transferencias y coordinación farmacéutica. Publicada en colaboración con CAJAMADRID y la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2003.
- Investigación y Siglo XXI. Publicada en colaboración con CAJAMADRID y la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2003.
- Síndrome agudo respiratorio grave y gripe aviar. Publicada en colaboración con la Real Academia Nacional de Medicina. 2004.
- Mesa Redonda. Regeneración hepática. Publicada en colaboración con la Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia de Farmacia. 2006.
- Mesa Redonda. El descubrimiento de nuevos fármacos en 2006. Publicada en colaboración con la Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia de Farmacia. 2008.
- Mesa Redonda. La seguridad en el paciente oncológico. Estándares internacionales para el manejo de citotóxicos. Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2009.
- Mesa Redonda. Seguridad del Paciente Oncológico. Visión Interdisciplinar. Publicada en colaboración con la Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia y Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. 2010.

### 3. Facsímiles

- Prontuario de Química, Farmacia y Materia Médica de Pedro Gutiérrez Bueno (Madrid, 1815). Prologado por la Dra M.<sup>a</sup> del Carmen Francés Causapé, 1994.
- Dissertacion hydraulico-pharmaceutica sobre el origen de las aguas de Hardales, su verdadero analysis chymico, y medicinales virtudes. De Juan José García (Málaga, 1759). Prologada por Dra. M.<sup>a</sup> del Carmen Francés Causapé, 1995.
- Concordia Aromatariorum Caesaraugstanensium DDLIII. Prologada por Dra. M.<sup>a</sup> del Carmen Francés Causapé. Publicada con la colaboración de la Real Academia de Farmacia y el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza.
- Edición Facsímil de los Discursos pronunciados en la Real Academia de Farmacia por el Excmo. Sr. D. José María Albareda Herrera. 2002.
- Edición Facsímil del Diccionario Biográfico y Bibliográficos de Autores Farmacéuticos Españoles. Por el Excmo. Sr. D. Rafael Rolán y Guerrero. Tomo I. Presentación por Dr. D. Antonio Portolés Alonso y prologado por la Dra. M.<sup>a</sup> del Carmen Francés Causapé. 2003.

### 4. Sesiones necrológicas

- Excmo. Sr. D. Enrique Otero Aenlle, 1992.
- Excmo. Sr. D. Felipe Calvo y Calvo, 1992.
- Excmo. Sr. D. Alfredo Carrato Ibáñez, 1995.
- Excmo. Sr. D. Juan Manuel López de Azcona. 1996.
- Excmo. Sr. D. Octavio Carpena Artés. 1997.
- Excmo. Sr. D. Víctor Villanueva Vadillo. 1998.
- Excmo. Sr. D. Eugenio Sellés Martí. 1998.
- Excmo. Sr. D. Ángel Vian Ortuño. 2000.
- Excmo. Sr. D. Arturo Mosqueira Toribio. 2000.
- Excmo. Sr. D. Rafael Cadórniga Carro. 2000.
- Excmo. Sr. D. Manuel Martel San Gil. 2001.

- Excmo. Sr. D. Manuel Gómez-Serranillos. 2004.
- Excmo. Sr. D. Pablo Sanz Pedrero. 2005.
- Excmo. Sr. D. Gregorio González Trigo. 2005.
- Excmo. Sr. D. León Villanúa Fungairiño. 2005.
- Excmo. Sr. D. Domingo Espinós Pérez. 2005.
- Excmo. Sr. D. Segundo Jiménez Gómez. 2005.
- Excmo. Sr. D. Ángel Santos Ruiz. 2005.
- Excmo. Sr. D. Antonio Portolés Alonso. 2005.
- Excmo. Sr. D. Emilio Fernández-Galiano. 2007.
- Excmo. Sr. D. Eduardo Primo Yúfera. 2008.
- Excmo. Sr. D. Gregorio Varela Mosquera. 2009.
- Excmo. Sr. D. Antonio Doadrio López. 2009.
- Excmo. Sr. D. Juan Manuel Reol Tejada. 2009.

## **5. Discursos leídos en las sesiones inaugurales de Curso.**

- La vida in vitro. Por el Excmo. Sr. D. Ángel Santos Ruiz. Año 1969. Agotado.
- El alma de la Farmacia. Por el Excmo. Sr. D. Eugenio Sellés Martí. Año 1970. Agotado.
- La contaminación del ambiente y su influencia en la vida. Por el Excmo. Sr. D. Juan Manuel López de Azcona. Año 1971.
- Los medicamentos de ayer y de hoy. Por el Excmo. Sr. D. Guillermo Folch Jou. Año 1972.
- La Química médica ante el futuro. Por el Excmo. Sr. D. Ramón Madroñero Peláez. Año 1973.
- La revolución farmacéutica. Por el Excmo. Sr. D. Manuel Jáuregui González. Año 1974.
- Consideraciones sobre la crisis de energía y de materias primas. Por el Excmo. Sr. D. Víctor Villanueva Vadillo. Año 1975.
- El problema de la creación de nuevos medicamentos. Por el Excmo. Sr. D. Arturo Mosqueira Toribio. Año 1976.
- El Real Colegio de Farmacia de San Fernando. Por el Excmo. Sr. D. Guillermo Folch Jou. Año 1977. Agotado.

- Momentos estelares del pensamiento científico. Por el Excmo. Sr. D. Enrique Otero Aenlle. Año 1978.
- Problemas de la utilización de la microbiología con fines bélicos. Por el Excmo. Sr. D. Eliseo Gastón de Iriarte. Año 1979. Agotado.
- La edafología como ciencia. El problema de las clasificaciones de suelos. Por el Excmo. Sr. D. Ángel Hoyos de Castro. Año 1980.
- Consideraciones históricas sobre la porcelana. Por el Excmo. Sr. D. Vicente Aleixandre Ferrándiz. Año 1981.
- Anecdotario microbiano. Por el Excmo. Sr. D. Lorenzo Vilas López. Año 1982.
- Consideraciones sobre la evolución farmacognóstica. Por el Excmo. Sr. D. Manuel Gómez Serranillos. Año 1983.
- Técnica y Medio Ambiente. Por el Excmo. Sr. D. Ángel Vian Ortuño. Año 1984.
- Albaro Alonso Barba. Un metalurgo del siglo de Oro. Por el Excmo. Sr. D. Felipe Calvo y Calvo. Año 1985.
- La ultracentrifuga de Svedberg. Un punto de partida de la Biología Molecular. Por el Excmo. Sr. D. Pablo Sanz Pedrero. Año 1986. Agotado.
- La Biosfera y el Hombre. Por el Excmo. Sr. D. Emilio Fernández Galiano. Año 1987.
- Del complejo droga a fármaco estructuralmente específico. Por el Excmo. Sr. D. Gregorio González Trigo. Año 1988.
- Bases experimentales en la farmacología y terapéutica del dolor. Por el Excmo. Sr. D. Perfecto García de Jalón y Hueto. Año 1989.
- El grave peligro de pensar. Por el Excmo. Sr. D. Román de Vicente Jordana. Año 1990.
- La contaminación ambiental y sus consecuencias biológicas y climatológicas. Por el Excmo. Sr. D. Antonio Doadrio López. Año 1991.
- Sistema Nervioso Central (SNC). Por el Excmo. Sr. D. Alfredo Carrato Ibáñez. Año 1992.

- El Universo del Medicamento. Por el Excmo. Sr. D. Rafael Cadór-niga Carro. Año 1993.
- Alimentación y cáncer. Por el Excmo. Sr. D. Manuel Ortega Mata. Año 1994.
- Legislación y Métodos en el control toxicológico de compuestos, residuos y vertidos. Por el Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas. Año 1995.
- Las plantas medicinales. Ejemplo de nuevo escenario en una clásica aproximación para el descubrimiento del medicamento. Por el Excmo. Sr. D. Antonio Monge Vega. Año 1996.
- Impresiones sobre Severo Ochoa. Por el Excmo. Sr. D. Julio Rodríguez Villanueva. Año 1997.
- Métodos cuánticos semiempíricos en el diseño de medicamentos. Por el Excmo. Sr. D. Arturo Mosqueira Toribio. Año 1998.
- Farmacología de la Inflamación. Por el Excmo. Sr. D. Domingo Espinós Pérez. Año 1999.
- Moléculas y Comunicación Biológica. Por el Excmo. Sr. D. Manuel Ruiz Amil. 2000.
- Supervivencia e Individualidad en Biología. Por el Excmo. Sr. D. Antonio Portolés Alonso. Año 2001.
- Proteínas del estrés. Implicaciones clínicas y objetivos terapéuticos. Excmo. Sra. Dña. María Cascales Angosto. Año 2002.
- Terapéutica Farmacológica en el anciano. Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé. Año 2003.
- La conservación del suelo. Base de su sostenibilidad y soporte de salud. Excmo. Sr. D. Segundo Jiménez Gómez. Año 2004.
- Avances en Geobotánica. Excmo. Sr. D. Salvador Rivas Martínez. Año 2005.
- Europa y globalización de la Sanidad. Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas. Año 2006.
- El desarrollo de fármacos. A propósito de la insuficiencia cardíaca: luces, sombras, reflexiones y perspectivas. Excmo. Sr. D. Juan Tamargo Menéndez. Año 2007.

- Desarrollo de mamíferos a la luz de los conocimientos científicos actuales: su interés sanitario. Excma. Sra. Dña. Ana M.<sup>a</sup> Pascual-Leone Pascual. Año 2008.
- Consideraciones sobre creencias, farmacia y terapéutica. Excma. Sra. Dña. María del Carmen Francés Causapé. Año 2009.
- Anecdotario de los primeros años de la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela (Siglo XIX): Un recuerdo a sus profesores y alumnos distinguidos. Excmo. Sr. D. José Miñones Trillo. Año 2010.

## 6. Otras publicaciones

- Diccionario biográfico y bibliográfico de autores farmacéuticos españoles. Por el Excmo. Sr. D. Rafael Roldán Guerrero. Tomo I, Año 1963. Agotado. Tomos II y III, Año 1975. Tomo IV, Año 1976.
- Código Deontológico Farmacéutico. Editado por el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España. Año 1991.
- Estatutos y Reglamento de la Real Academia de Farmacia. Textos refundidos. Año 1992.
- Tríptico explicativo de “El Museo de la Real Academia de Farmacia”. Año 1995.
- Colección de tarjetas postales sobre el “Museo de la Real Academia de Farmacia”. Por la Excma. Sra. Dña. M.<sup>a</sup> del Carmen Francés Causapé. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Año 1998.
- Jornada sobre Atención Farmacéutica. Año 1998.
- Avances de la Ciencias a través del Premio Nobel. Por el Excmo. Sr. D. Ángel Santos Ruiz. Año 1998.
- El Museo de la Real Academia de Farmacia. Por Excma. Sra. Dña. M.<sup>a</sup> del Carmen Francés Causapé. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Año 1999.

- Historia de la Real Academia de Farmacia. por Excmo. Sr. D. Toribio Zúñiga Sánchez-Cerrudo. Revisado anotado e ilustrado por la Excma. Sra. Dña. M.<sup>a</sup> del Carmen Francés Causapé. Año 2002.
- Lecturas Singulares 1. Del corazón y la mente. Excmo. Sr. D. Manuel Losada Villasante. Año 2005.
- Lecturas Singulares 2. Recuerdo y desagravio a León Felipe. Excmo. Sr. D. Mariano Turiel de Castro. Año 2006.
- Lecturas Singulares 3. La Farmacia en tiempos de Miguel de Cervantes Saavedra. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Año 2006.
- Homenaje a las grandes figuras de las Ciencias Farmacéuticas: Obdulio Fernández y Enrique Molés. Coordinador: Excmo. Sr. D. Francisco González de Posada. Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia y Amigos de la Cultura Científica Academia de Ciencias e Ingeniería de Lanzarote. Año 2006.
- En memoria de un maestro. Ángel Santos Ruiz. Editora: Dra. María Cascales Angosto. Año 2006.
- Diccionario Terminológico de las Ciencias Farmacéuticas. Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Año 2007.
- Lecturas Singulares 4. Fe, esperanza y caridad en el mundo del medicamento: desde la Grecia clásica a la molecularidad del s. XXI. Excmo. Sr. D. Mario Sapag-Hagar. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Año 2007.
- Lecturas Singulares 5. Farmacia y Arte. (Ligera visión de la pintura española a través de Goya, Velázquez y Murillo). Excmo. Sr. D. Guillermo Tena. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Año 2007.

- II Encuentro Iberoamericano de Academias de Farmacia (AIAF). Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Año 2007.
- Lecturas Singulares 6. Breve historia de la experimentación animal. Excmo. Sr. D. Alberto Giráldez Dávila. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Año 2008.
- Homenaje a José Celestino Mutis en el Bicentenario de su fallecimiento. Sesión Científica coordinada por el Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Año 2008.
- Lecturas Singulares 7. El dilema de muchos españoles en 1808: ser leales a Fernando VII o colaboracionistas con José I. Excmo. Sr. D. José Antonio Cabezas Fernández del Campo. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Año 2009.
- En el 250 aniversario del nacimiento de Vicente Cervantes (1758-1829): Relaciones científicas y culturales entre España y América durante la ilustración. Coordinadores: María Teresa Miras Portugal, Antonio González Bueno y Antonio Doadrio Villarejo. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Año 2009.
- La Triaca Magna. Discurso de Recepción de Académico de Número del Excmo. Sr. D. Javier Puerto Sarmiento. Año 2009.
- La Farmacia y la Química: un país, dos culturas. Discurso de Recepción de Honor del Excmo. Sr. D. José Elguero Bertolini. Año 2009.
- Pharmacology of synaptic transmission: an electrophysiologist’s view. Discurso de Recepción de Académico de Honor del Excmo. Sr. Erwin Neher. Año 2009.
- Reglamento de la Real Academia Nacional de Farmacia. Año 2009.

- Lecturas Singulares 8. Agua, fuente de vida. Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza. Publicada en colaboración con Fundación CAJAMADRID y Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Año 2010.
- Lecturas Singulares 9. La demencia de un rey: Fernando VI (1746-1759). Sra. Dña. Rosa Basante. Publicada en colaboración con Fundación CAJAMADRID y Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Año 2010.
- Lecturas Singulares 10. Sinopsis bioclimática de la tierra y mapas bioclimáticos de Suramérica. Excmo. Sr. D. Salvador Rivas-Martínez. Publicada en colaboración con Fundación CAJAMADRID y Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Año 2010.
- Ciencia y salud global: la brecha del desarrollo. Discurso de Recepción de Académico de Número de la Excma. Sra. Dña. María José Alonso Fernández. Año 2010.

